

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
JUN 24 '64

BEGRÜNDET VON
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

H. L. JENSEN LYNGBY	C. B. VAN NIEL PACIFIC GROVE	R. NILSSON UPPSALA
G. PIEKARSKI BONN	E. G. PRINGSHEIM GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE	W. H. SCHOPFER BERN
H. TAMIYA TOKIO	T. WIKÉN DELFT	

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES GÖTTINGEN	R. HARDER GÖTTINGEN
--------------------------------------	-------------------------------

31. BAND · 1. HEFT

MIT 149 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 17. OKTOBER 1958)



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1958

Archiv für Mikrobiologie

Zeitschrift für die Erforschung der pflanzlichen Mikroorganismen. Begründet 1930 von
J. Behrens, F. Boas, A. Rippel. Berlin, Springer

Das „Archiv für Mikrobiologie“ steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96,—.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20,— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30,— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40,— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotos u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. H. L. Jensen, Lyngby/Dänemark, Statens Planteavlslaboratorium, Bakteriologisk Afdeling,

Prof. Dr. C. B. van Niel, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station,

Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbrukshögskolan, Mikrobiologiska Institutionen,

Prof. Dr. G. Piekarski, Bonn/Rh., Venusberg, Hygienisches Institut, medizinisch-parasitologische Abteilung, der Universität,

Prof. Dr. E. G. Pringsheim, Göttingen, Untere Karspüle, Pflanzenphysiologisches Institut,

Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. H. Tamiiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokuwaga Institute for Biological Research,

Prof. Dr. T. Wikén, Delft/Holland, Julianalaan 67 A, Laboratorium voor Microbiologie Technische Hogeschool

oder an die

Schriftleitung:

Prof. Dr. A. Rippel-Baldes, Göttingen, Albrechtstraße 6,

Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Untere Karspüle 2

Springer-Verlag

Berlin · Göttingen · Heidelberg

31. Band

Inhaltsverzeichnis

1. Heft

	Seite
AUGUST RIPPEL-BALDES zum 70. Geburtstag	1
BRESCH, C., Grundlagen der Populationsgenetik von Bakteriophagen	3
BUKATSCH, F., Versuche zur Sichtbarmachung von Geißelaggregaten der Bakterien im Fluoreszenzmikroskop. Mit 1 Textabbildung	11
DREWS, G., Untersuchungen über Granulabildung und Phosphateinbau in wachsenden Kulturen von <i>Mycobacterium phlei</i> . Mit 5 Textabbildungen	16
ENGEL, H., und J. FRIEDERICHSEN, Die Carotinoide von <i>Mutinus caninus</i> Huds. Mit 1 Textabbildung	28
FISCHER, W. K., Über einige Wirkungen hoher Konzentrationen anionischer grenzflächenaktiver Substanzen auf Bakterien. Mit 7 Textabbildungen	33
FRANKE, W., und W. HEINEN, Zur Kenntnis des Fettsäureabbaus durch Schimmelpilze. I. Mitteilung. Über die Methylketonbildung durch Schimmelpilze. Mit 3 Textabbildungen	50
FUCHS, W. H., und H. METZ, Über den Einfluß von Chinonoximbenzoylhydrazon auf das Wachstum von <i>Bacillus subtilis</i> . Mit 6 Textabbildungen	60
GIESBRECHT, P., und G. PIEKARSKI, Zur Organisation des Zellkerns von <i>Bacillus megaterium</i> . Mit 8 Textabbildungen	68
HARDER, R., und E. UEBELMESSER, Über die Beeinflussung niederer Erdphycomyceten durch Flechten.	82



A. Rypel

Zum 70. Geburtstag am 1. November 1958

August Rippel-Baldes zum 70. Geburtstag

Am 1. November dieses Jahres ist Prof. Dr. Dr. h.c. AUGUST RIPPEL-BALDES 70 Jahre alt geworden. Er wurde in Birkenfeld (Nahe) geboren und erzogen. Auf dem humanistischen Gymnasium hat er als Sohn eines Kaufmannes und als Grenzlandbewohner die Bildung und die Eindrücke erhalten, die seinen weltoffenen Charakter mit dem untrüglichen Blick für alles Echte, Wahre und Schöne geprägt und ihm eine tiefe Liebe zur Heimat geschenkt haben. So auf das Beste ausgerüstet, studierte er von 1907 bis 1912 in Göttingen, München und Marburg, wo er bei ARTHUR MEYER, dem damals auf dem Gebiet der Mikrobiologie als Zweig der Botanik führenden deutschen Gelehrten, zum Dr. phil. promovierte.

Von 1912 bis 1917 wirkte RIPPEL als Assistent an der Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt Augustenberg (Baden). Dort hat er verschiedene botanische und agrikulturchemische Themen bearbeitet und außerdem eine Weinrebe gezüchtet, die sich auch heute noch großer Wertschätzung erfreut. RIPPEL meinte hierzu einmal in seiner schalkhaften Art, daß die Anerkennung seiner Rebe ihm besondere Freude bereite, weil diese Züchtung das einzig Vernünftige sei, das er in seinem Leben geschaffen habe.

Anschließend ging RIPPEL als Assistent an das Agrikulturchemische und Bakteriologische Institut in Breslau, wo er sich 1919 habilitierte. Hier begann er mit seinen Untersuchungen, die später zur Widerlegung des Mitscherlich-Bauleschen Gesetzes der Wachstumsfaktoren führten.

1923 wurde er als Nachfolger von ALFRED KOCH nach Göttingen berufen. Von hier aus vollzog sich unter seiner Führung in Deutschland die Entwicklung der Mikrobiologie zu einer selbständigen Disziplin, was auch äußerlich durch den neuen Institutsnamen „Institut für Mikrobiologie“ an Stelle von „Institut für Landwirtschaftliche Bakteriologie“ in Erscheinung trat. Die Einheit der Mikrobiologie als drittem selbständigen Zweig der Biologie neben Botanik und Zoologie fand er begründet in der Stellung der Mikroorganismen und ihrer Tätigkeit im Stoffumsatz der Natur. Mit der stetigen Bildung der Lebensgrundlage für alle höheren Lebewesen durch Schließung des natürlichen Stoffkreislaufs ist ihm das Gebiet der Mikrobiologie die „Zymologie der Gesamtheit der Lebensvorgänge“.

Es war RIPPELS Ziel, das wissenschaftliche Verständnis der mikrobiellen Prozesse in Natur und Kultur im einzelnen wie im ganzen aus den exakt naturwissenschaftlichen Erkenntnisgrundlagen zu erarbeiten und darzustellen. Gemeinsam mit seinen Mitarbeitern und einer ständig wachsenden Zahl von Doktoranden dehnte RIPPEL seine Forschungen

auf viele Gebiete seines Faches aus. Nur einige seien hier stichwortartig erwähnt: Morphologie der Mikroorganismen, insbesondere die Begeißelungs- und Zellkernfragen bei Bakterien; Physiologie, z. B. der Stoffwechsel einzelner Spezialisten (Cellulose-, Tannin-, Chitinzersetzer, Eisen und Schwefel oxydierende Mikroorganismen); Energiebilanzen verschiedener Stoffwechseltypen, Eiweißbildung, Bedeutung der Kohlenensäure für Heterotropie; Spurenelemente, Ionenantagonismus, Farbstoffe und Antibiotica, Humusbildung; Ökologie, vor allem natürliche Standorte der Mikroorganismen in Boden und Wasser, Antibiose, Symbiose, Rhizosphäre, Parasitismus und Domestikation. Manche seiner Forschungsergebnisse konnten auch unmittelbar praktische Bedeutung gewinnen, z. B. die mikrobiologische Fettsynthese.

Eine große Zahl von Veröffentlichungen gibt Rechenschaft von der geleisteten Arbeit. Außer Beiträgen zu mehreren Handbüchern verfaßte RIPPEL verschiedene, im In- und Ausland geschätzte und anerkannte Bücher, so „Wachstumsgesetze bei höheren und niederen Pflanzen“, „Vorlesungen über theoretische Mikrobiologie“, „Vorlesungen über Bodenmikrobiologie“ und „Grundriß der Mikrobiologie“. Gemeinsam mit J. BEHRENS und F. BOAS gründete RIPPEL im Jahre 1930 das „Archiv für Mikrobiologie“, um dem neuen Fach in Deutschland ein eigenes Organ zu schaffen. Das „Archiv“ ist heute im In- und Ausland weit verbreitet.

RIPPEL sind Erfolge und Anerkennung nicht in den Schoß gefallen. Seine Bestrebungen stießen bei manchen Wissenschaftlern und bei den Hochschulbehörden vielfach auf mangelndes Verständnis, wenn nicht Widerstand, und er hat oft sehr kämpfen müssen, um seine Ideen durchzusetzen. Bei allen Schwierigkeiten war ihm sein besonders glückliches Familienleben, das er aus seinem inneren Erlebnisreichtum mit Geschichten und Tiermärchen beschenkte, die beste Hilfe. Aus seinem Garten spricht der Naturfreund, der die durchlichtete anspruchslose Birke liebt. Auch schafften ihm seine stetig gepflegten Interessen an Heimat- und Vorgeschichte Sphären, die er mit seinem Wesen lebendig durchdrang und ihn so seinen Schülern auch menschlich zu einem leuchtenden Vorbild werden ließen.

So kann AUGUST RIPPEL-BALDES heute auf ein wahrhaft erfülltes Leben zurückblicken. Seine großen Verdienste fanden ihre Anerkennung darin, daß ihn die Göttinger Akademie der Wissenschaften schon 1939 zu ihrem Mitglied ernannte, und daß die Universität Gießen ihm 1957 die Ehrendoktorwürde verlieh. Seine Schüler, die ihn als gütigen Lehrer verehren, seine vielen Freunde im In- und Ausland und der Verlag gratulieren ihm herzlichst und wünschen ihm noch viele Jahre eines glücklichen Feierabends in Gesundheit und Zufriedenheit.

H. BORTELS

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln, Abt. für Mikrobiologie)

Grundlagen der Populationsgenetik von Bakteriophagen *

Von

CARSTEN BRESCH

(Eingegangen am 23. Mai 1958)

Bei genetischen Experimenten an höheren Organismen ist es möglich, einzelne Parentalindividuen zu kreuzen und die direkte Nachkommenschaft einer solchen Kreuzung zu untersuchen. Aus der Häufigkeit des Auftretens bestimmter Merkmalskombinationen konnten, in Verbindung mit zytologischen Beobachtungen, die grundlegenden Prinzipien und Mechanismen der Merkmalsübertragung aufgeklärt werden.

Bei entsprechenden Untersuchungen an Bakteriophagen erschwert deren Kleinheit nicht nur jede morphologische Beobachtung erheblich, sondern verhindert die Handhabung einzelner Individuen generell. Eine Kreuzung von zwei Phagenmutanten ist daher nur mit vielen Partikeln beider Stämme möglich, die zufallsstatistisch an viele Wirtsbakterien adsorbiert werden, in denen dann, unserer direkten Beobachtung entzogen, die Reduplikation und genetische Rekombination der Phagenpartikel stattfindet. Der Untersuchung zugänglich sind erst wieder nach Ablauf der sogenannten Latenzperiode, d. h. nach der Lyse der Bakterien, die Endprodukte dieser Prozesse, nämlich die dabei frei werdenden etwa 20—300 fertigen Nachkommenphagen. Aufgabe der Phagen-genetik ist es, ohne die Hilfe von zytologischer Beobachtung zur Verfügung zu haben, allein aus den Häufigkeiten von Merkmalskombinationen, die in der Latenzperiode ablaufenden Mechanismen zu erschließen.

I. Die Pool-Kinetik

Adsorbiert ein Bacterium ein oder mehrere Phagenpartikel, so dringen diese — oder genauer nur deren DNS-Anteile — in die Bakterienzelle ein (HERSHEY u. CHASE 1952). Die eingedrungenen Strukturen werden als „vegetative“ Phagenpartikel bezeichnet und sind nicht mehr infektiös. Sie sind jedoch fähig, mit Hilfe des Bakterienstoffwechsels wieder „reife“, d. h. infektiöse Partikel mit Proteinhüllen zu bilden. Die ersten dieser reifen Nachkommenphagen treten in den Zellen etwa nach Ablauf der halben Latenzperiode auf (DOERMANN 1951).

Es ist evident, daß zur Entstehung der Nachkommenphagen eine vielfache Reproduktion der genetischen Substanz erforderlich ist. Hierfür bieten sich zwei Wege an: Entweder vermehren sich die vegetativen

* Herrn Professor Dr. A. RIPPEL-BALDES zum 70. Geburtstag gewidmet

Partikel selbst (direkt oder indirekt) durch geometrische Progression (Zweiteilung), oder es wird in einer Art Druckverfahren nach dem vorliegenden Muster eine Kopie nach der anderen hergestellt. LURIA hat für beide Annahmen die zu erwartende statistische Verteilung der Klongrößen von spontanen Mutationen in Würfeln von einzelnen Bakterien berechnet und mit dem Experiment verglichen (LURIA 1951).

Die Einzelwurf-Technik (single burst) wurde von BURNET (1929) eingeführt. Man verdünnt die Suspension der infizierten Bakterien so weit, daß bei einer weiteren Aufteilung in viele gleiche Portionen im Mittel weniger als ein Bacterium auf eine Portion entfällt. Jede Portion wird nach Ablauf der Latenzperiode dann auf je einer Petrischale plattiert. Sie enthält den Wurf keines, eines und nur in seltenen Fällen mehrerer Bakterien (Poisson-Wahrscheinlichkeiten).

Die von LURIA experimentell gefundene Verteilung der Klongrößen von Mutationen entsprach der Erwartung einer Zweiteilung. Dieses Ergebnis bedeutet zwar nicht unbedingt, daß sich der vegetative Phage als *Ganzes* durch Zweiteilung vermehrt, es beweist aber, daß zumindest die einzelnen Gene des Phagen zweigeteilt werden. Mehr noch, es zeigt, daß die Produkte von kompletten oder partiellen Reduplikationen *gleichberechtigt* neben ihre Erzeuger treten, d. h. im weiteren Verlauf sich selbst ebenfalls geometrisch reproduzieren.

Dieser Befund bildet die wichtigste Grundlage der Populationsgenetik von Bakteriophagen.

Wird ein Bacterium von verschiedenen Phagenmutanten infiziert, so werden in der Nachkommenschaft Rekombinanten beobachtet. Deren Anteil hängt von dem benutzten Phagen und dem betrachteten Genpaar ab. Die Technik der vorzeitigen Lyse (premature lysis), die von DOERMANN (1951) entwickelt wurde, gestattet es, die Kinetik der Rekombinanten-Entstehung zu verfolgen.

Hierzu wird eine Suspension infizierter Bakterien in eine sogenannte Lysis-Mischung verdünnt. Diese besteht aus 10^{-2} mol. NaCN und einem hochtitrigen, jedoch stark UV-inaktivierten Lysat eines anderen Phagenstammes (meist T6). Die CN⁻-Ionen stoppen sofort weitere Phagenvermehrung innerhalb des Bacteriums und bringen kurz darauf mit Hilfe der UV-inaktivierten Phagen die Bakterienzelle zur Lyse. Hierdurch werden alle in der Zelle bereits vorhandenen fertigen Phagen in Freiheit gesetzt und können durch Plattierung gezählt werden.

Mit dieser Technik konnte DOERMANN zeigen, daß der Anteil der Rekombinanten an den schon fertigen Partikeln im Laufe der Latenzperiode ansteigt. Betrachtet man die in einem Zeitintervall hinzugekommenen Partikel, so lassen sich daraus Rückschlüsse auf die zu dieser Zeit vorhandenen Anteile der verschiedenen genetischen Typen im sogenannten „Pool“ der vegetativen Phagen ziehen. Hierbei wird eine Reifung zufälliger Partikel angenommen, was durch experimentelle Ergebnisse von VISCONTI u. GAREN (1953) sowie von HERSHEY (1953) gerechtfertigt wird.

Auf diese Weise konnten auch BRESCH u. TRAUTNER (1955) an T 1 einen etwa linearen Anstieg des Rekombinantenanteils im Pool während der Latenzperiode nachweisen, was unter Berücksichtigung der gleichberechtigten Vermehrung aller Partikel eine gleichbleibende Wahrscheinlichkeit für Rekombinationsprozesse je Partikel bedeutet. Erst gegen Ende der Latenzperiode zeigt sich ein Abbiegen des ursprünglich linearen Anstiegs des Rekombinantenanteils. Ein derartiger Effekt ist zu erwarten, wenn die Rekombinantenbildung in einzelnen, aufeinander folgenden Rekombinationsprozessen vor sich geht. Dann nämlich müßten mit steigender Rekombinanzzahl im Pool derartige Prozesse auch zur Rückrekombination zu Parentaltypen führen, was die bis dahin konstante relative Zuwachsrates an Rekombinanten verkleinern würde.

Diese Kinetik der Rekombinantenbildung rechtfertigt die Auflösung des gesamten Rekombinationsgeschehens in einzelne zufällige, konsequente und voneinander unabhängige Rekombinationsprozesse zwischen zufälligen Partnern im Pool. Ein derartiger einzelner Rekombinationsprozess soll eine „Rekombinationsserie“ genannt werden und kann mehrere (eventuell voneinander abhängige) Rekombinationsakte umfassen. Die Zufälligkeit der Rekombinationsserien wird besonders deutlich bei der Betrachtung von Einzelwürfen mischinfizierter Bakterien. In diesen ist nämlich der Rekombinantenanteil einer starken Fluktuation unterworfen, die sich auch auf reziproke Typen erstreckt.

Die mathematische Analyse des sich so ergebenden populationsgenetischen Problems wurde von VISCONTI u. DELBRÜCK (1953) durchgeführt. Sie basiert also auf den Grundannahmen: 1. Vegetative Partikel bilden Tochterpartikel, die gleichberechtigt, d. h. reproduktions- und rekombinationsfähig neben ihre Erzeuger treten. 2. Zwischen zufälligen Partnern finden zeitlich zufällige Rekombinationsserien statt. Die hierbei entstehenden Rekombinanten sind ebenfalls gleichberechtigte Partikel des Pools.

Beide Annahmen sind durch experimentelle Daten gerechtfertigt. Zur mathematischen Durchführung sind aber noch weitere Annahmen erforderlich, nämlich: 3. Die für Rekombinationsakte benötigte Zeit soll kurz sein gegen die Reduplikationsdauer, d. h. Rekombination soll keine merkliche Verzögerung der Reduplikation hervorrufen.

Für diese dritte Annahme bestehen keine experimentellen Anhaltspunkte. Sie wurde lediglich aus Gründen der Einfachheit getroffen. Es ist jedoch wesentlich, daß im Gegensatz zu den ersten beiden Annahmen ein Nichtzutreffen der dritten Voraussetzung nur zu einer quantitativen Verschiebung des Ergebnisses, nicht jedoch zur grundsätzlichen Ungültigkeit der Betrachtungsweise führt.

Für die mathematische Formulierung einer Kreuzung mit nur zwei Faktoren ist keinerlei weitere Annahme erforderlich. Bei Behandlung

einer 3 Faktor-Kreuzung dagegen ergeben sich zwei zusätzliche Fragen, die jedoch eher dem Rekombinationsmechanismus selbst als der Pool-Kinetik zuzuordnen sind.

II. Einfluß des Rekombinationsmechanismus

Die erste dieser Fragen betrifft die Zahl der zu einer Rekombinationsserie beisteuernden Elternstrukturen, während die zweite die gegenseitige Beeinflussung von einzelnen Rekombinationsakten innerhalb einer Serie beinhaltet (Interferenz).

A. Paarweise oder komplette Kooperation

Grundsätzlich kann die Bildung eines neuen Rekombinanten-Partikels durch Kooperation von stets zwei und nur zwei Elternpartikeln erfolgen, oder es können daran mehrere, im Extremfalle alle Partikel des Pools beteiligt sein.

Die erste Möglichkeit schließt sich eng an die Genetik höherer Organismen an und wurde von VISCONTI u. DELBRÜCK (1953) in deren mating-Theorie als vierte Voraussetzung eingeführt. Unter dieser Annahme von „Paarungen“ jeweils zweier zufälliger Elternpartikel zur Rekombinantenbildung kann ein phagen-infiziertes Bacterium einem großen Käfig verglichen werden, in den einige genetisch verschiedene Kaninchen gesetzt werden, die sich über einige Jahre hin zufällig paaren und vermehren.

Neben dieser konservativen Betrachtung besteht aber seit vielen Jahren das „partial replica“ Modell, das auf eine Idee von LURIA (1947) zurückgeht und vornehmlich von DOERMANN, CHASE u. STAHL (1955) vertreten wurde. Nach diesem Modell entstehen Rekombinanten durch den Zusammenbau von Teilreplikas, die von verschiedenen zufälligen Elternmatrizen zuvor gebildet wurden. Es können also tatsächlich mehrere, im Grenzfall alle Parentalstrukturen einer Zelle zu einer Serie beitragen. In Rekombinationsserien dieser Art kooperieren sämtliche Partikel des Pools gleichberechtigt. Wieviele und welche Elternmatrizen zu einer bestimmten Serie beitragen, ist dem Zufall überlassen.

BRESCH u. STARLINGER (1958) zeigten kürzlich, daß derartige Modelle einer „kompletten Kooperation“ im wesentlichen der gleichen mathematischen Behandlung genügen wie die mating-Theorie. Für 2 Faktor- und symmetrisch infizierte 3 Faktor-Kreuzungen sind sogar beide Vorstellungen grundsätzlich ununterscheidbar. Eine experimentelle Prüfungsmöglichkeit ergibt sich jedoch prinzipiell in asymmetrisch infizierten 3 Faktor- oder 3 Allel-3 Eltern-Kreuzungen. In derartigen Kreuzungen erhält man nämlich nach beiden Vorstellungen unterschiedliche Häufigkeitserwartungen für bestimmte Rekombinantentypen. Die experimentelle Unterscheidung von paarweiser und kompletter Kooperation begegnet jedoch größeren technischen Schwierigkeiten, an deren Überwindung zur Zeit gearbeitet wird.

Mit diesen vier Voraussetzungen gelingt die vollständige mathematische Behandlung der Populationsgenetik von Bakteriophagen für alle denkbaren 3 Faktor-Kreuzungen. Man erhält ein System von Gleichungen, das sich für paarweise oder komplette Serien-Kooperation nur geringfügig unterscheidet (siehe hierzu BRESCH u. STARLINGER 1958). In beiden Fällen werden die Anteile der verschiedenen genetischen Kombinationsmöglichkeiten einer Kreuzung gegeben als Funktion von 4 Parametern, nämlich von q_I und q_{II} , den jeweiligen Rekombinationswahrscheinlichkeiten der beiden Außengene mit dem Mittelgen in einer einzelnen Rekombinationsserie, $q_{I,II}$, der Wahrscheinlichkeit für eine doppelte Rekombination beider Außengene mit dem Mittelgen in einer einzelnen Rekombinationsserie und s , der „mittleren“ Serienerfahrung je Partikel in einem Infektionscyclus. (Siehe hierzu Abschnitt C.)

In beiden Fällen (paarweise oder komplette Kooperation) lassen sich durch Umkehrung des Gleichungssystems aus den experimentell erhaltenen Rekombinantenanteilen einer beliebigen 3 Faktor-Kreuzung Zahlenwerte für drei Produkte berechnen, nämlich für $s \cdot q_I$; $s \cdot q_{II}$ und $s \cdot q_{I,II}$.

Die Einzelberechnung der vier Parameter s , q_I , q_{II} und $q_{I,II}$ ist jedoch auf der Basis der bisher getroffenen vier Annahmen allein prinzipiell unmöglich.

B. Interferenz

Wir haben eben gesehen, daß die bisherigen Annahmen noch keine Entscheidung darüber erlaubten, ob im Laufe eines Infektionscyclus viele Rekombinationsserien (s groß) mit jeweils nur recht kleinen Rekombinationswahrscheinlichkeiten (q_I , q_{II} , $q_{I,II}$ klein) ablaufen oder ob in nur wenigen Serien (s klein) viele Rekombinationen erfolgen (q_I , q_{II} , $q_{I,II}$ groß).

Da das Experiment nur drei unabhängige Zahlenwerteliefert, können die vier Parameter nur dann berechnet werden, wenn eine weitere Beziehungsgleichung angenommen wird. Sinnvollerweise wählt man dazu eine Gleichung, in der $q_{I,II}$ als Funktion von q_I und q_{II} angegeben wird. Die drei Rekombinationswahrscheinlichkeiten q_I , q_{II} und $q_{I,II}$ sind nämlich voneinander nicht unabhängig. Ihre Beziehung wird durch das Interferenzverhalten während einer Serie festgelegt, d. h. durch die Frage, ob und wie auftretende Rekombinationsakte die Wahrscheinlichkeit für weitere Rekombinationsakte beeinflussen.

Würde keinerlei Beeinflussung zwischen den Rekombinationsakten bestehen, so wäre $q_{I,II} = q_I \cdot q_{II}$ (Fehlen von Interferenz).

Für eng-gekoppelte Gene ist diese Annahme sicherlich falsch, denn CHASE u. DOERMANN (1958) konnten zeigen, daß mit erheblich erhöhter Wahrscheinlichkeit in der Nähe eines Rekombinationsaktes noch weitere

Rekombinationsakte auftreten. Diese negative Interferenz erwies sich als *abstandsabhängig*, d. h. stieg für kleiner werdende Abstände stark an. Ein analoger Befund wurde auch bei *Aspergillus* und *Neurospora* beobachtet.

Trotz dieses Ergebnisses mag die Annahme eines Fehlens von Interferenz für Kreuzungen mit relativ großen Genabständen in guter Näherung gerechtfertigt sein. Aufgabe weiterer Untersuchungen ist es, diesen Fragenkomplex zu klären.

Es sei darauf hingewiesen, daß es sich bei der eben besprochenen Interferenz um Geschehnisse innerhalb der einzelnen Rekombinationsserie handelt. Diese ist der von der Genetik höherer Organismen her bekannten Interferenz vergleichbar und darf nicht mit einer zweiten abstandsunabhängigen negativen Interferenz verwechselt werden, die sich zwangsläufig aus einer Populationsgenetik mit zufallsverteilten Rekombinationsserien zwischen zufälligen Partnern ergibt, wenn man die summarischen Rekombinationswahrscheinlichkeiten und nicht die einzelnen Rekombinationsserien betrachtet.

C. Die Serienerfahrung

Es mag auf den ersten Blick befremdend erscheinen, daß in der bisherigen Darstellung der Populationsgenetik der eigentliche Mechanismus des Rekombinationsgeschehens gar nicht berücksichtigt wurde. Es konnte ganz abstrakt von einzelnen Rekombinationsserien gesprochen werden, wobei lediglich die Fragen der paarweisen bzw. kompletten Kooperation und die der Interferenz behandelt werden mußten.

Tatsächlich sind für die mathematische Analyse des Problems alle weiteren Einzelheiten ohne Belang. Das heißt aber nicht nur, daß der mathematischen Abstraktion eine Reihe von interpretierenden Modellen zugeordnet werden kann, sondern auch, daß all diese Modelle niemals mit Hilfe von Rekombinantenhäufigkeiten aus beliebigen 3 Faktor-Kreuzungen unterschieden werden können.

Betrachten wir z. B. die Interpretationsmöglichkeiten der paarweisen Kooperation: festgelegt ist also lediglich die Bedingung, daß die aus einer Serie hervorgehenden Rekombinanten ihre genetische Information nur von zwei Elternpartikeln herleiten können. Es bleibt offen, ob die Elternstrukturen selbst in dieser Serie verloren gehen können (z. B. durch Brüche und kreuzweise Wiedervereinigung) oder ob sie zwangsläufig unberührt aus der Serie neben den Rekombinantenpartikeln wieder hervorgehen. Ebenso bleibt offen, ob in einer Serie stets zwei reziproke Rekombinanten oder nur eine Einzelrekombinante gebildet wird. Diese Allgemeingültigkeit gewinnt die mathematische Analyse aus der Benutzung der mittleren Serienerfahrung als tragenden Parameter. Diese mittlere Serienerfahrung ist zu Beginn des Infektionszyclus für alle

Partikel des Pools $s = 0$. Findet nun aber eine Serie statt, so erhalten alle Partikel, die aus dieser Serie als Rekombinanten hervorgehen können (auch wenn sie das in dem Spezialfall gerade dieser Serie nicht tun) die Serienerfahrung $s = 1$. Die Serienerfahrung geht dabei *nicht* auf Elternpartikel über, die die Serie unverändert wieder verlassen *müssen*. Trägt in einer weiteren Serie ein Partikel mit seiner Serienerfahrung $s = 1$ zur Bildung einer neuen Rekombinante bei, während die übrigen beitragenden Elternpartikel die Serienerfahrung $s = 0$ haben, so erhalten alle Abschnitte der neu gebildeten Rekombinante die Serienerfahrung $s = 1$ mit Ausnahme derjenigen Abschnitte, die sich von der Elternstruktur mit $s = 1$ herleiten. Diese Abschnitte erhalten die Serienerfahrung $s = 2$. Entsprechend wird bei weiteren Serien verfahren.

Es ist ersichtlich, daß bereits die Serienerfahrung *eines* Partikels nicht einheitlich zu sein braucht und man daher bereits von der *mittleren* Serienerfahrung eines *bestimmten* Partikels sprechen muß, die sich aus den s -Werten seiner einzelnen Abschnitte, gewogen mit deren Längen, ergibt.

Der Mittelwert der jeweiligen mittleren Serienerfahrung der einzelnen Partikel liefert die mittlere Serienerfahrung schlechthin, die von einem Wert $s = 0$ zu Beginn der Latenzperiode aus ständig ansteigt. Sie erreicht bei der Lyse der Bakterien einen bestimmten Wert, der charakteristisch für jeden Phagenstamm ist. Dieses ist der in Abschnitt A benutzte s -Wert.

Die tatsächliche mittlere *Zahl* von Rekombinationsserien je Infektionscyclus bleibt unbestimmbar. Sie kann erst dann aus der mittleren Serienerfahrung eines Phagenstammes berechnet werden, wenn bekannt ist, wie viele Rekombinantenpartikel in einer einzelnen Serie gebildet werden.

III. Schlußbemerkungen

Wir haben gesehen, daß die vollständige Analyse der Populationsgenetik von Bakteriophagen auf fünf Voraussetzungen basiert:

1. Gleiche geometrische Vermehrung aller Eltern- und Tochterstrukturen.
2. Zufällige Rekombinationsserien zwischen zufälligen Partnern.
3. Keine Verzögerung der Reduplikation durch Rekombination.
4. a) paarweise oder b) komplette Kooperation von Elternstrukturen in einer Serie.
5. Spezielle Annahmen über die Interferenz innerhalb einer Rekombinationsserie.

Diese Voraussetzungen führen zu einer mathematischen Lösung für beliebige 3 Faktor-Kreuzungen, die noch erhebliche Freiheiten für den Rekombinationsmechanismus enthält, über die prinzipiell keine Aussagen auf Grund von Rekombinantenanteilen beliebiger Kreuzungen möglich sind. Fragen des Rekombinationsmechanismus müssen auf anderen Wegen, z.B. durch statistische Analysen von Einzelwürfen gelöst werden.

Die so gewonnene generelle Behandlung des populationsgenetischen Problems bedarf noch zweier Korrekturen, die aus Gründen der Vollständigkeit nicht unerwähnt bleiben dürfen.

Die erste dieser Schwierigkeiten erwächst aus der Tatsache der Reifung von vegetativen Strukturen zu infektiösen Phagen. Da nur gereifte Partikel unserer Beobachtung zugänglich sind, entsprechen die experimentell beobachteten Rekombinantenanteile nicht direkt den analogen Größen der mathematischen Behandlung, sondern (zufällige Reifung in konstanter Rate vorausgesetzt) deren Mittelwerten während der Periode der Reifung. Dieser Gesichtspunkt wurde bereits in der Behandlung von VISCONTI u. DELBRÜCK (1953) berücksichtigt.

Schließlich muß aber noch die eingangs erwähnte statistische Infektion der Bakterien beachtet werden. Während die mathematische Behandlung davon ausgeht, daß in allen Bakterien das gleiche Verhältnis von Elternphagen vorhanden ist, unterliegt de facto dieses Verhältnis berechenbaren Schwankungen. Diese Tatsache benötigt eine weitere Korrektur der mathematischen Analyse, die von LENNOX, LEVINTHAL u. SMITH (1953) angegeben wurde.

Literatur

BRESCH, C., u. TH. TRAUTNER: Zur Kinetik der Rekombinantenbildung bei T1 Bakteriophagen. *Z. Naturforsch.* **10b**, 436 (1955). — BRESCH, C., u. P. STARLINGER: Zum Problem der genetischen Rekombination von Bakteriophagen. Im Druck: *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre*. — BURNET, F. M.: A method for the study of bacteriophage multiplication in broth. *Brit. J. exp. Path.* **32**, 109, (1929).

CHASE, M., and A. H. DOERMANN: High negative interference over short segments of the genetic structure of bacteriophage T4. Im Druck: *Genetics*.

DOERMANN, A. H.: Intracellular phage growth as studied by premature lysis. *Fed. Proc.* **10**, 591 (1951). — DOERMANN, A. H., M. CHASE and F. W. STAHL: Genetic recombination and replication in bacteriophage. *J. cell. comp. Physiol.* **54**, 51 (1955).

HERSHEY, A. D., and M. CHASE: Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. gen. Physiol.* **36**, 39 (1952). — HERSHEY, A. D.: Nucleic acid economy in bacteria infected with bacteriophage T2. II. Phage precursor nucleic acid. *J. Gen. Physiol.* **37**, 1 (1953).

LENNOX, E. S., C. LEVINTHAL and F. SMITH: Anhang in LEVINTHAL, C., and N. VISCONTI: Growth and recombination in viruses. *Genetics* **38**, 508 (1953). — LURIA, S.: Reactivation of irradiated bacteriophage by transfer of self-reproducing units. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **33**, 253 (1947). — The frequency distribution of spontaneous bacteriophage mutants as evidence for the exponential rate of phage reproduction. *Cold Spring Harbour Symp. quant. Biol.* **16**, 463 (1951).

VISCONTI, N., and M. DELBRÜCK: The mechanism of genetic recombination in phage. *Genetics* **38**, 5 (1953). — VISCONTI, N., and A. GAREN: Unity of the vegetative pool in phage-infected bacteria. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **39**, 620 (1953).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität München)

Versuche zur Sichtbarmachung von Geißelaggregaten der Bakterien im Fluoreszenzmikroskop*

Von

FRANZ BUKATSCH

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 14. März 1958)

Im Zeitalter der Elektronenmikroskopie mag es müßig erscheinen, sich um die lichtoptische Darstellung von Bakteriengeißeln zu bemühen, wo doch die elektronenoptische Abbildung dieser ungemein zarten Bewegungsorganelle — zumal nach Schrägbedampfung des Objekts — in unübertroffener Schärfe und Plastik möglich ist. Es sind aber infolge des hohen Preises und der noch relativen Seltenheit des Elektronenmikroskopes nur wenige Untersucher in der Lage, sich eines solchen Gerätes zu bedienen.

Die bisher üblichen lichtoptischen Geißeldarstellungsmethoden zerfallen in zwei Hauptgruppen: 1) die Hellfeldebeobachtung mit Vorbeizung und folgender Färbung des Präparates und 2) die Dunkelfeldanwendung, welche auch die Beobachtung lebender Zellen und ihrer Fortbewegungsart gestattet. Das Phasenkontrastverfahren brachte auf diesem Gebiet keine wesentlichen Fortschritte.

Die Durchführung der unter 1) genannten Verfahren ist verhältnismäßig langwierig, erfordert Übung und die Anwendung starker mikroskopischer Vergrößerungen (Ölimmersion) mit den Nachteilen des kleinen Gesichtsfeldes und der geringen Tiefenschärfe der Objektive hoher Apertur.

Die Dunkelfeldbetrachtung ist sehr leistungsfähig und erfordert wenig Vorbereitung. REICHERT konnte bereits 1909 nicht nur Geißelaggregate an lophotrichen (*Spirillum volutans*) und peritrichen Bakterien (*Proteus vulgaris*) im Dunkelfeld auf ihre Sichtbarkeitsbedingungen genau untersuchen, sondern wies auch den Weg, der hier zum Ziele führt. Es kommt vor allem auf möglichsten Kontrast zwischen dem seitlich angestrahlten Objekt und dem dunklen Untergrund an, die Auflösungskraft und Vergrößerung des Objektivs ist demgegenüber weniger wichtig. So gelang es dem Autor, mit mittleren Trockensystemen, bei etwa 650facher Vergrößerung, Geißeln zu beobachten, was den Vorzug des großen Gesichtsfeldes und damit auch des bessern Überblickes gegenüber der Immersionsanwendung bedingt.

Seit den bahnbrechenden Arbeiten HAITINGERS (1934, 1938) besteht die Möglichkeit, durch Einwirkung fluoreszierender Stoffe („Fluorochrome“) Zellfeinstrukturen einfach und schnell im UV-Mikroskop sichtbar zu machen. Je nach Affinität (elektrodsorptiver Bindung oder chem. Reaktion, bzw. Speicherung) nehmen bestimmte Zell- oder Gewebeelemente das Fluorochrom auf und strahlen dann, von UV-Strahlen angeregt, „sekundäre Fluoreszenz“ aus. So leuchten die behandelten Objekte hell auf dunklem Grunde, womit sich unter Umständen ganz ähnliche Vorteile ergeben, wie sie REICHERT im Dunkelfeld zur Geißeldarstellung benutzte.

* Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL-BALDES zum 70. Geburtstag ergebenst gewidmet.

Tatsächlich hat die Bakteriologie seither reichlich und mit Erfolg von HAITINGERS Entdeckung Gebrauch gemacht, was am besten aus STRUGGERS Monographie (1949) hervorgeht. Besonders wertvoll erwies sich die Erregung von sekundären Fluoreszenzen zur Vereinfachung und Abkürzung von klinischen Routineuntersuchungen. So war z. B. die bisher übliche Färbung und Gegenfärbung zur Darstellung säurefester Stäbchen (*Mycobact. tuberculosis* und *leprae*) zeitraubend, umständlich und auch von schwankender Sicherheit. Bei der Tuberkel- und Lepriadiagnose hat HAGEMANN (1937) durch seine Auramin-Methode die genannten säurefesten Keime selektiv fluorochromiert, so daß sie sich schon bei rund 300facher Vergrößerung sehr deutlich von der Umgebung abheben. War der Zeitgewinn bei dieser Präparation zwar nicht sehr groß, so erlaubte die schwache Vergrößerung doch eine bessere Übersicht und damit raschere Auswertung. Den entschiedensten Zeitgewinn bei der Tbc-Diagnose brachte das Verfahren von HAITINGER u. SCHWERTNER (1940): nach 30 sec Einwirkung von Acridingelb ermöglicht kurze Differenzierung in Salzsäurealkohol die Feststellung von *Mycobacterium tuberculosis* innerhalb 1 min(!).

Die eben geschilderten Möglichkeiten der Fluoreszenzmikroskopie, in einer Art Dunkelfeldwirkung Feinstrukturen schon bei mittleren Vergrößerungen hervorzuheben und durch Anwendung geeigneter Fluorochrome die Präparation sehr zu vereinfachen und abzukürzen, bewogen mich 1941, die fluoreszenzoptische Darstellung von Bakteriengeißeln zu versuchen. Durch den zweiten Weltkrieg und nachher durch das Fehlen eines geeigneten Fluoreszenz-Kameramikroskopes wurden meine Arbeiten lange unterbrochen¹.

Während STRUGGER (1949) in seiner umfassenden Monographie die fluoreszenzoptische Darstellung der undulierenden Membran von Trypanosomen erwähnt, finden sich dort keine Angaben über die Sichtbarmachung von Bakteriengeißeln. Daher erschien die Fortsetzung unserer Versuche gerechtfertigt.

Material und Methode

Als Rohmaterial diente spirillenhaltige Schweinejauche; davon ließen wir Tropfen schräg am Objektträger ablaufen und einfach eintrocknen. In dieser Form lassen sich die Präparate jahrelang aufbewahren. Vor Gebrauch wurde in der Flamme fixiert und dann für 1—5 min mit Farbstofflösung 1 : 1000 bedeckt. Kurzes Spülen in Fließwasser machte die Präparate beobachtungsfertig.

Das Präparat wurde zunächst bei etwa 300—400facher Vergrößerung durchmustert; wurden Geißeln gesehen, so erfolgte die Aufnahme mit Ölimmersion, um die zarten Gebilde auch in der Photographie genügend deutlich darzustellen.

¹ Herrn Prof. Dr. L. BRAUNER danke ich für die Bereitstellung der großen Fluoreszenzeinrichtung für Zeiß-Winkel-Standardmikroskope mit Kleinbild-Aufsatzkamera.

Ergebnisse

Probeweise kamen zunächst saure Fluoreszenzfarbstoffe zur Anwendung, wobei das Medium mit verdünnter Essigsäure oder Tropfen n-Salzsäure leicht angesäuert worden war. Es ist entsprechend der Lage des IEP nur dann eine Anfärbung der aus Eiweiß bestehenden Zellorganelle zu erwarten (Bethesche Regel). Wir wandten nur als sehr kräftig bekannte Fluorochrome an: Fluorescein, Eosin, Brillantsulfoflavin, wovon das letztgenannte zu anderen Zwecken, nämlich zur Sporendarstellung, von STRUGGER (1949) schon erfolgreich erprobt worden war.

Leider blieben die damit erzielten Ergebnisse deswegen unbefriedigend, weil der Untergrund des Präparates zwischen den Zellen, offenbar von Jaucheresten verursacht, ebenfalls hell aufleuchtete und damit ein Erkennen von Feinstrukturen unmöglich machte. Differenzieren mit Alkohol führte hier nicht zum Ziel. Trotzdem behielt ich die oben beschriebene Art von Rohpräparaten bei, denn in den meisten Fällen der Praxis hat man ja keine Aufschwemmung von Reinkulturen vor sich, sondern Bakterien in eiweißhaltigen Nähr-, bzw. Körperflüssigkeiten, und auch da sollte sich die Fluorochromierungsmethode bewähren.

Nun versuchte ich eine Reihe basischer Farbstoffe, die zu den Zellkörpern und ihren Anhängen besondere Affinität aufweisen sollten. Trypaflavin, das sich bei der Trypanosomendarstellung bewährt hatte, gab unbefriedigende Resultate; ebenso schieden die wiederholt erfolgreich angewandten Fluorochrome Coriphosphin und Acridinorange aus. Bei diesen beiden Farbstoffen lag der Grund darin, daß sie von den fixierten Zellen so kräftig gespeichert wurden, daß als Fluoreszenzfarbe ein tiefes Kupferrot auftrat, das gegen den Untergrund zu wenig Helligkeitskontrast ergab. Da die Empfindlichkeit des menschlichen Auges ihr Maximum im gelben und grünen Spektralbereich aufweist, schien die Verwendung gelber und gelbgrüner Fluorochrome aussichtsreicher. Das in der Tbc-Untersuchung so wirkungsvolle Acridingelb gab bei Einwirkungen von 1—5 min nur matte Bilder, ebenso das sonst ausgezeichnete Berberinsulfat.

Die Berberinsulfat-Fluorochromierung ließ sich aber zur Brillanz steigern, wenn man der wäßrigen Berberinsulfatlösung 1 : 1000 bis zur Sättigung verflüssigtes Phenol zusetzte. Die filtrierte Lösung soll möglichst frisch verwendet werden. Nach einer Einwirkungsdauer von 2 min oder etwas länger erzielt man eine strahlend hell-grünlichgelbe Fluoreszenz der Bakterienleiber mit guter Differenzierung der Innenstrukturen und eine gute Darstellung der Geißeln (Abb. 1).

Zur Aufnahmetechnik sei bemerkt, daß bei Verwendung normaler, panchromatischer Filme die Vorschaltung eines relativ strengen UV-Sperrfilters am Okular notwendig ist, denn UV-Reste, die bei visueller Beobachtung durchaus nicht stören,

verschleiern sonst das Negativ. Die durch das Orangefilter nötigen langen Belichtungszeiten lassen sich wohl durch Verwendung von Emulsionen gesteigerter Rotempfindlichkeit bedeutend abkürzen.

Als sehr geeignet erwies sich auch wäßrige Auramin-Lösung 1 : 1000; hier genügt eine Einwirkung von 1 min, um die Zellen und ihre Bewegungsorganelle leuchtend goldgelb zu fluorochromieren. Unter der Wirkung der UV-Strahlen blaßt der Kontrastreichtum des Präparates nur wenig ab; auch ist das Präparat, unter Deckglas einfach in Immersionsöl eingeschlossen, mindestens monatelang haltbar.

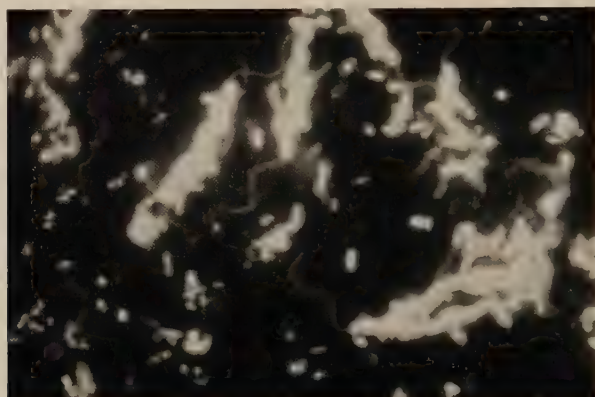


Abb. 1. Fluorescenzoptische Geißeldarstellung von *Spirillum* sp. mit Karbol-Berberinsulfat 1 : 1000, 2 min Einwirkung. Zeiß-Winkel Großes Kamera-Fluorescenzmikroskop, Oelimm. 100 $\times$, Huyghens-Okular 10 $\times$, Kleinbildfilm pandrom. 17/10 Din., 25 min exp.

Eine Beizung der Präparate mit Aluminiumsalzen bringt in der Regel keine Vorteile, es sei denn, daß man durch Vorbehandlung mit Al-Ionen und nachfolgende Einwirkung mikrochemischer Nachweismittel für Aluminium, wie 1 $\%$ ige alkoholische Morinlösung oder Oxin-(8-Oxychinolin-)Lösung eine Fluoreszenzreaktion hervorrufen will. Nach kurzer, etwa 1 min währender Behandlung mit konzentrierter Kalialaunlösung wurden die Präparate mit destilliertem Wasser abgespült und dann für einige Minuten mit Morin- bzw. Oxychinolinlösung bedeckt. Nach Oxineinwirkung wurde auch „Räuchern“ mit Ammoniakdämpfen versucht, doch blieb das Ergebnis hier mittelmäßig. Dagegen ist Morin imstande, den Al-vorbehandelten Objekten eine lebhaft gelbgrüne Fluoreszenz zu verleihen, welche auch die Geißeln sichtbar werden läßt. So läßt sich die als Spurennachweis für Aluminium bekannte Goppelsroedersche Reaktion auch für unseren Zweck ausnützen. Man wird aber der einfacheren Auramin- oder Karbol-Berberinsulfatanwendung den Vorzug geben.

Bei unserem Objekt, einem großen Spirillum, besteht die Geißel, wie REICHERT (1909) schon erkannte, und was HOUWINK (1953) durch elektronenoptische Abbildung eindrucksvoll bewies, aus einer Art „Zopf“ feinsten, verdrehten Fibrillen. REICHERT wies darauf hin, daß die zart-peritrich begeißelten Stäbchen (wie etwa *Proteus vulgaris*) selbst unter optimalen Dunkelfeldbedingungen nur dann Geißeln erkennen lassen, wenn diese durch Schwimmen der Zellen in viscosum Medium zu Aggregaten vereinigt werden. Fluoreszenzoptische Untersuchungen dieser Verhältnisse sind im Gange; darüber soll später berichtet werden.

Zusammenfassung

1. Es gelingt, an geeigneten Objekten die Vorteile der Fluorochromierung, nämlich rasche und einfache Präparation und das Ausreichen mittlerer Vergrößerungen zur Beobachtung, auch auf die Darstellung von Bakteriengeißeln anzuwenden.

2. Da es sich hierbei um die Erregung einer reinen Sekundärfluoreszenz durch kurze Einwirkung sehr verdünnter Farbstoffe handelt, werden die Geißeln normal, nicht wie bei den bisher üblichen Beizverfahren zu lichtoptischer Darstellung künstlich verdickt, wiedergegeben.

3. Als besonders zur Geißeldarstellung geeignet erwiesen sich wäßrige Lösungen 1:1000 von Auramin bzw. Karbol-Berberinsulfat. Beide brauchen nur wenige Minuten zu wirken. Auch die sogenannte Goppelsroedersche Mikroreaktion für Aluminium läßt sich zur Geißeldarstellung der Bakterien heranziehen.

Literatur

HAGEMANN, P.: Dtsch. med. Wschr. **1937**, 514. — HAITINGER, M.: Abderhalden Hand. d. biol. Arb. Meth. II/3, 3307 (1934). — Fluoreszenzmikroskopie, Leipzig 1938. — HAITINGER, M., u. R. SCHWERTNER: Zbl. f. Bakt. I **145**, 141 (1940). — HOUWINK, A. L.: Biochim. biophys. Acta **10**, 360 (1953).

REICHERT, C.: Zbl. Bakt. I **51**, 14 (1909).

STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopie u. Mikrobiologie, Hannover 1949.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin)

Untersuchungen über Granulabildung und Phosphateinbau in wachsenden Kulturen von *Mycobacterium phlei**

Von

GERHART DREWS

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Mai 1958)

Nach den bisher durchgeführten cytologischen und biochemischen Untersuchungen an *Mycobakterien* darf angenommen werden, daß am Aufbau der metachromatischen Granula (synonym: electron-scattering granules, Volutinkörnchen) kondensierte Phosphate beteiligt sind (DREWS 1958, GLAUERT u. BRIEGER 1955, KNAPPE u. Mitarb. 1958, MUDD u. Mitarb. 1956, MEISSNER u. LEMKE 1955 und WINKLER 1953) und ihre Bildung mit der Zunahme des sogenannten säureunlöslichen Phosphors in der Zelle parallel läuft (KNAPPE u. Mitarb.). Die Granula entstehen in ruhenden Zellen nur, wenn eine Energiequelle, Phosphat, K^+ und O_2 ausreichend zur Verfügung stehen (MUDD u. Mitarb. 1956 sowie SALL u. Mitarb. 1956). *Aerobacter aerogenes* bildet Volutingranula nur unter sauren Bedingungen, wenn das Zellwachstum begrenzt wird und eine C-Quelle und Phosphat vorhanden sind; K^+ und Mg^{++} fördern die Metaphosphatbildung (DUGUID u. Mitarb. 1954, SMITH u. Mitarb. 1954). Eine starke Polyphosphatanreicherung konnte bei phosphat-verarmten Hefen und Bakterien nach Überimpfen in phosphathaltige Medien beobachtet werden (DUGUID 1948, HOFFMANN-OSTENHOF u. Mitarb. 1955, KNAPPE u. Mitarb. 1958 sowie SCHMIDT u. Mitarb. 1949).

Verschiedentlich wird angegeben, daß die Granulabildung erst gegen Ende des Wachstums einsetzt (DREWS 1958, WINKLER 1953, SMITH u. Mitarb. 1954 sowie RUSKA u. Mitarb. 1952). Dieser Befund steht im Einklang mit der vielfach geäußerten Vermutung, daß die in den Granula gespeicherten kondensierten Phosphate eine Energiereserve darstellen, die bei Wachstumsbeginn aufgebraucht wird. Wie Vorversuche ergaben, kann aber unter bestimmten Voraussetzungen schon sehr rasch eine starke Granulabildung einsetzen.

* Herrn Professor Dr. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag gewidmet.

Da in der Literatur genauere Angaben über die Granulabildung und den gleichzeitig ermittelten Phosphatgehalt kaum zu finden sind, soll in der vorliegenden Mitteilung über Ergebnisse an jungen wachsenden Kulturen berichtet und damit ein Beitrag zur Physiologie der meta-chromatischen Granula und des Phosphorstoffwechsels der Mycobakterien gegeben werden.

Methodik¹

Die vorliegenden Untersuchungen wurden hauptsächlich an *Mycobacterium phlei* (SG 346), vereinzelt auch an *Myc. lacticola* (SG 382) durchgeführt. Die Bakterien wuchsen auf Sauton-Nährboden² entweder auf Agar oder nach dem Submersverfahren in Rundkolben mit 100 ml Nährlösung auf dem Schütteltisch bei 37°C. Auf Agar bilden die Bakterien relativ lange, einzeln liegende Stäbchen aus, die sich besonders gut cytologisch untersuchen lassen. Um aber für analytische Bestimmungen genügend Material zur Verfügung zu haben, mußten raschwüchsige Submerskulturen angelegt werden, die bei *Myc. lacticola* noch einen Zusatz von Tween 80 enthielten. Die in Schüttelkulturen auftretende Verklumpung wurde in Kauf genommen. Zur Bestimmung der Granulazahl wurden Ausstriche mit Toluidinblau nach LINDEGREN (1950) gefärbt (2 Std) und je Probe die in 200 Bakterien enthaltenen Granula gezählt. In den Diagrammen wurde die Granulazahl auf 100 Bakterien bezogen. Natürlich konnten bei dieser Methode die submikroskopisch kleinen Granula (SHINOHARA 1955, 1957) keine Berücksichtigung finden. Es wurden nur die Einschlüsse als Granula bewertet, die kräftig violett gefärbt und scharf gegen das umgebende Plasma abgegrenzt erscheinen. Gegen Ende des Wachstums kann man in den Bakterien gelegentlich bestimmte Bezirke erkennen, die sich kräftiger als das umgebende Plasma färben, aber nur diffus begrenzt erscheinen. Sie wurden nicht als Granula gezählt. Die analytischen Untersuchungen wurden in Anlehnung an die Methoden von SCHNEIDER (1946) sowie WINDER u. DENNENY (1956) durchgeführt: Nach Extraktion mit kalter TCE³ (Fraktion 1) und Alkohol, Äther (Fraktion 2) wurde mit heißer Perchlorsäure extrahiert (Fraktion 3) und der Rückstand durch Veraschung aufgeschlossen (Fraktion 4). Nähere Einzelheiten sind der Arbeit von KNAPPE u. Mitarb. (1958) zu entnehmen.

Ergebnisse

Die Normalkultur

In einer früheren Mitteilung (KNAPPE u. Mitarb. 1958) wurde der Verlauf der Granulabildung in einer Flüssigkeitskultur angegeben. Die höchste Granulazahl war nach 48 Std, also in der 2. Hälfte der Wachstumsphase, zu beobachten. Als Impfmateriel diente in diesem Fall eine 48 Std. alte Flüssigkeitskultur. Um die günstigsten Bedingungen für die Granulabildung zu ermitteln, wurde in Vorversuchen Material von

¹ Frl. WEIDERMANN und Frl. HEINZE danke ich für ihre Hilfe bei den analytischen und bakteriologischen Arbeiten.

² Asparagin 0,4%; Glycerin 6,0%; Citronensäure 0,2%; K_2HPO_4 0,05%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05%; Eisenammoncitrat 0,005%. pH 6,9.

³ Abkürzungen im Text: TCE = Trichloressigsäure, THFA = Tetrahydrofurfurylalkohol, Sn = Sauton, THF = Tetrahydrofuran, P = Phosphor.

Schrägaragar und aus Schüttelkulturen auf Agar bzw. in flüssigen Nährboden geimpft, so daß sich folgende Kombinationen ergaben:

1. Agar → Agar; 2. Agar → flüssiges Medium; 3. flüssiges Medium → Agar; 4. flüssiges Medium → flüssiges Medium.

Am weitaus geeignetsten für die Beobachtung der Granulabildung in den ersten Wachstumsphasen erwies sich der 2. Weg. Die Veränderungen

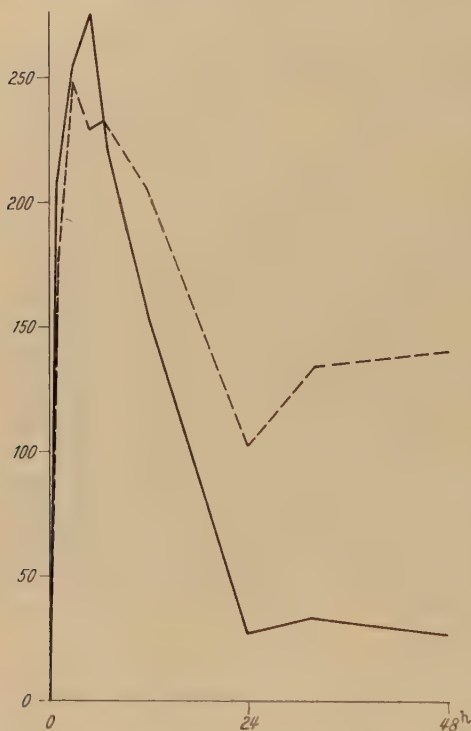


Abb. 1. *Mycobacterium phlei*. Granulabildung in Submerskultur. Ordinate: Gesamtzahl der Granula in 100 Bakterien. Abszisse: Bebrütungszeit in Stunden. Gestrichelte Linie = Sauton-Nährlösung + 1% Tetrahydrofurfurylalkohol. — Sn; — — Sn + 1% THFA

getragen, getrocknet und mit Toluidinblau gefärbt wurden. In der Regel wurde die Granulaentwicklung bis zu 48 Std verfolgt, weil in dieser Zeit erfahrungsgemäß die wesentlichen Veränderungen stattfanden. Jede Reihe wurde mehrmals wiederholt, die jetzt zu schildernde Sauton-Normalkultur 10mal. Das Alter der Ausgangskultur betrug meistens 5—6 Tage. Jüngere und ältere Kulturen führten meist zu dem gleichen Ergebnis. Gelegentliche Abweichungen konnten nicht zum Alter der Kultur in Beziehung gebracht werden.

Die ausgezogene Kurve in der Abb. 1 gibt den typischen Verlauf der Granulabildung in der eben geschilderten Normalkultur wieder. Die

in Zahl und Größe der Granula erfolgten rasch und waren sehr ausgeprägt. Das ist auch verständlich, weil die Bakterien einzeln liegend in der Flüssigkeit hin- und herbewegt werden und somit die Voraussetzung für einen intensiven Stoffaustausch gegeben ist. Auf Agar ist die lag-Phase sehr lang und die Granulabildung erfolgt nur allmählich. Die Veränderungen sind auch relativ gering, so daß nicht immer eindeutig zu entscheiden ist, ob ein wirklicher Effekt oder eine methodisch bedingte Schwankung der Werte vorliegt.

Die noch zu schildernden Ergebnisse sind daher fast ausschließlich so entstanden, daß aus Kolben, die mit einer Öse Schrägaragarmaterial beimpft, auf dem Schütteltisch bei 37°C bebrütet wurden, in bestimmten Zeitabständen Proben entnommen, diese einmal mit eiskaltem Aqua dest. ausgewaschen und dann auf Objektträger auf-

Zahl der Granula je 100 Bakterien steigt in der 1. Std etwa um das 10fache. Während in der Ausgangskultur 84% der Bakterien keine Granula ausbilden, 24% 1 und 8% 2 Granula in der Zelle enthielten, waren nach 1 Std nur 8% der Bakterien noch ungranuliert, 12% enthielten 1, 53% 2, 20% 3 und 7% 4 Granula in der Zelle. Die höchste Granulazahl ist nach 5 Std zu beobachten. Danach erfolgt ein steiler Abfall, bis nach 24 Std der Ausgangswert wieder erreicht ist. Wie Tab. 1 zeigt, bildet die Mehrzahl (im allgemeinen 50%) der granulaträgenden Bakterien 2 Granula aus. Im Laufe der Bebrütung nehmen die stärker

Tabelle 1. *Mycobacterium phlei*, Granulabildung in Flüssigkeitskultur
(Schütteltisch bei 37° C)

Ausgangsmaterial: Schrägagar 8 Tage alt

Alter der Kultur in Stunden	Zahl der Granula je Bacterium						Gesamtzahl der Granula in 200 Bakterien
	0	1	2	3	4	5	
0	168	24	8	—	—	—	40
1	15	25	106	41	13	—	412
3	2	9	101	57	28	3	508
5	—	11	82	67	26	14	550
7	9	28	93	48	19	3	448
12	72	20	62	29	8	9	308
24	162	20	17	1	—	—	56
32	150	33	15	2	—	—	69
48	158	30	12	—	—	—	54

granulierten Bakterien an Zahl zu (siehe besonders 3—7 Std), was im wesentlichen auf die wachsende Granuladichte, zum Teil auch auf die Zunahme der Länge der Bakterien zurückzuführen ist. Gegen Ende der Bebrütungszeit (nach 1—2 Tagen) enthalten die meisten granulierten Bakterien nur noch 1 Granulum.

Ähnlich verlaufen auch die an anderen Kulturen gewonnenen Kurven: Steiler Anstieg und Abfall innerhalb der ersten 12 Std und dann allmähliche Abnahme der Granulazahl (Abb. 2, I; 5, 1). Die Lage des Granulamaximums schwankt zwischen 1 und 5 Std. Die außerordentlich starke Zunahme der Granulierung wird noch dadurch erhöht, daß die Granula ja nicht nur an Zahl sondern parallel dazu auch an Größe beträchtlich zunehmen, ein Umstand, der in den Kurven nicht mit berücksichtigt wurde. Vermindert sich die Zahl der Granula, so nimmt allmählich auch die Größe und gegen Ende der Beobachtungszeit auch der Grad der Metachromasie ab, d. h. die Granula erscheinen nicht mehr leuchtend rot-violett, sondern nur noch dunkel blau-violett gefärbt.

Der Teil der Kurve, der die Zeit vom Ende des steilen Kurvenabfalls bis zum Ende der Beobachtungszeit erfaßt (etwa 14—18 Std), verläuft bei den beobachteten Kulturen nicht immer so gleichmäßig wie der

eben beschriebene Teil. Das Streuen der Werte ist zum Teil auf die beginnende Klumpenbildung zurückzuführen. Die Bakterien in den Klumpen bleiben länger granuliert, als die einzeln liegenden. Gelegentlich ist nach 20—36 Std Kulturdauer vor dem endgültigen Abfall nochmals ein leichter Anstieg zu beobachten (Abb. 2, I).

Granulierung und Phosphorgehalt

Der häufig postulierte Zusammenhang zwischen Granulabildung und P-Stoffwechsel (DREWS, KNAPPE u. Mitarb., DUGUID u. Mitarb.,

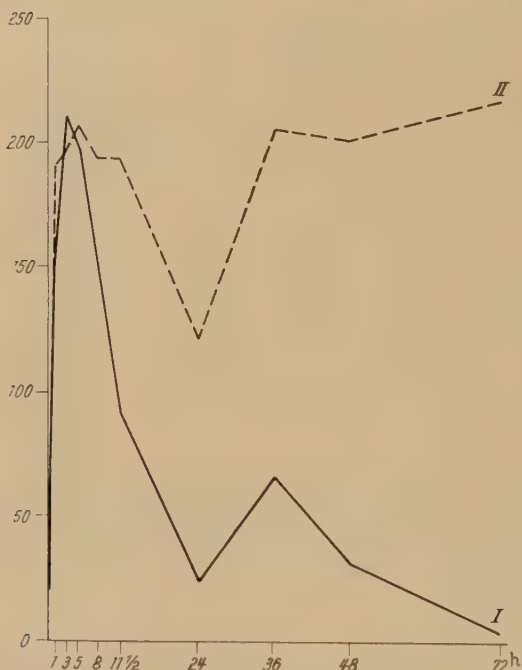


Abb. 2. *Mycobacterium lacticola*. Granulabildung in Sauton-Nährlösung (I); II = mit einem Zusatz von 0,8% THFA

SMITH u. Mitarb., SALL u. Mitarb.) legt es nahe, beide Größen unter den genannten Bedingungen zu verfolgen und miteinander zu vergleichen. Die Granulakurve in Abb. 3 zeigt den charakteristischen Verlauf mit einem Maximum nach 3 Std. Der heiße Perchlorsäureextrakt (Fraktion 3) nimmt ebenfalls bis zu 3 Std stark zu, um dann bis 24 Std allmählich abzufallen. Die dazwischenliegenden Werte (5 und 8 Std) schwanken sehr stark, so daß es zur Ausbildung eines sekundären Maximums nach 8 Std kommt. Der Abfall bei 6 Std wird zum Teil durch eine gleichzeitige Zunahme der

Fraktion 1 kompensiert. Der Gehalt an Orthophosphat im Perchlorsäureextrakt (0,5 n) nach $\frac{1}{2}$ stündiger Hydrolyse bei 75° C zeigt diese Schwankungen nicht, sondern läuft bis 8 Std der Granulierung parallel, um dann konstant zu bleiben. Die in Ätheralkohol löslichen P-Verbindungen und der nach TCE-, Lipoid- und Perchlorsäureextraktion verbleibende Rest-P verändern sich während der Versuchszeit kaum. Der in TCE lösliche P bildet nur ein schwaches Maximum aus. Im wesentlichen zeigen also die in heißer Perchlorsäure löslichen P-Verbindungen, besonders das dabei frei werdende Ortho-

phosphat eine gewisse Parallelität zum Verlauf der Granulierung. Dieses Ergebnis entspricht grundsätzlich dem in einer früheren Mitteilung angegebenen Befund (KNAPPE u. Mitarb.), nur daß dort Granulabildung und Phosphatgehalt des Perchlorsäureextraktes erst nach 2 Tagen gegen Ende der Wachstumsperiode ihr Maximum erreichten, während in der in Abb. 3 charakterisierten Kultur schon zu Beginn des Wachstums die genannten Maxima ausgebildet werden. Einen grundsätzlich anderen Verlauf im Verhältnis zu Granula- und Fraktion-3-Maximum nehmen daher die N-Kurven in den beiden Kulturen. Während hier (Abb. 3) bei gleichzeitiger Abnahme der P-Verbindungen der N-Gehalt deutlich zunimmt und auf eine Eiweiß-Synthese hindeutet, fällt der N-Gehalt in der Kultur mit dem P-Maximum nach 48 Std. ständig ab.

Der Einfluß von Tetrahydrofurfurylalkohol und anderen Alkoholen

Nach WINDER u. DENNENY (1954, 1956) fördert THFA bei *Mycobacterium smegmatis* die Synthese von Polyphosphaten. Im folgenden soll der Einfluß dieser Substanz auf die Granulabildung und den Phosphateinbau bei *Myc. phlei* beschrieben werden. Die Kulturfolge war die gleiche wie sie für die Normalkultur beschrieben wurde, nur daß die Flüssigkeitskulturen einen Zusatz von THFA erhielten. Im Gegensatz zu dem Verhalten von *M. smegmatis* (WINDER u. DENNENY) trat bei

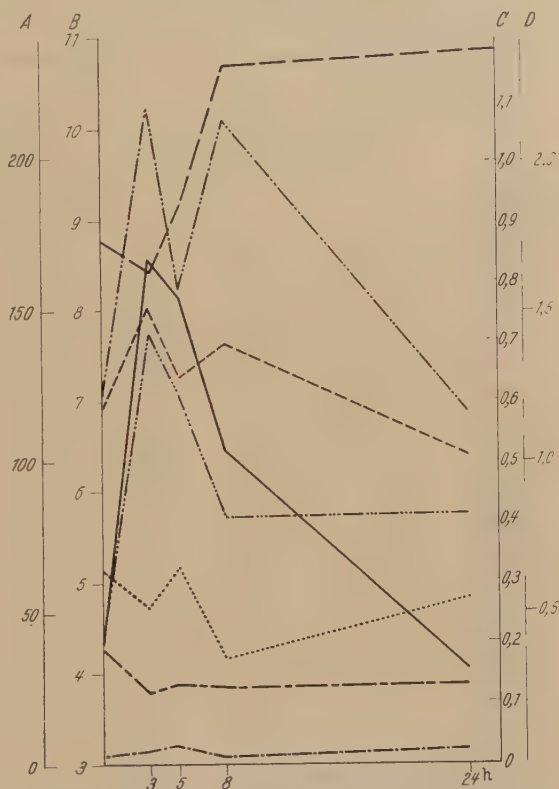


Abb. 3. *Mycobacterium phlei*. Granulabildung und Phosphorgehalt. Normalkultur. Ordinat: A Gesamtzahl der Granula in 100 Bakterien; B mg Gesamt-N/100 mg Trockensubstanz; C Gesamt-P der Substanz in mg P/100 mg Trockensubstanz; D P-Gehalt der Fraktionen in mg P/100 mg Trockensubstanz. — Granula/100 Bakt.; — — — Gesamt-N; - - - - Gesamt-P; ····· Fraktion 1; — · — · Fraktion 2; — · — · Fraktion 3; — · — · Fraktion 4

M. phlei bei Konzentrationen über 1% eine starke Wachstumshemmung ein, unter 0,5% dagegen war der beobachtete stimulierende Effekt nur noch gering. Deshalb wurde für *M. phlei* in Flüssigkeitskulturen im allgemeinen eine Konzentration von 0,7 Vol.-% THFA angewandt. Wie die Abb. 1 u. 2 zeigen, tritt nach THFA-Zusatz ebenfalls eine rasche Erhöhung der Granulazahl ein. Lage und Höhe des Granulamaximums sowie der Kurvenverlauf in den ersten 10—12 Std stimmen grundsätzlich mit der Normalkultur überein. In einzelnen Fällen ist die stärkste

Tabelle 2. *Mycobacterium phlei*, Granulabildung in Flüssigkeitskultur
(Schütteltisch bei 37°C) unter Zusatz von 0,7% THFA
Ausgangsmaterial: Schrägagar, 6 Tage alt

Alter der Kultur in Stunden	Zahl der Granula je Bacterium							Gesamtzahl der Granula in 200 Bakterien
	0	1	2	3	4	5	7	
0	171	21	8	—	—	—	—	27
1/2	88	34	55	18	4	—	—	219
1	70	25	63	32	5	5	—	292
2	44	19	79	37	17	4	—	276
3	42	20	86	34	15	2	—	364
4	40	24	82	50	4	—	—	354
5	20	35	65	57	17	5	1	436
6	21	30	97	46	5	1	—	387
7	34	28	75	49	11	3	—	384
8	52	30	66	40	10	2	—	332
10	42	58	78	21	1	—	—	281
12	127	20	30	18	4	1	—	155
16	63	59	62	12	4	—	—	235
24	58	60	72	9	1	—	—	235
28	57	45	86	12	—	—	—	253
32	56	59	72	12	1	—	—	243
36	53	75	61	10	1	—	—	231
41	57	71	56	6	—	—	—	221
49	51	52	79	17	1	—	—	265

Granulabildung etwas später als in der Normalkultur zu beobachten. Die erreichten Maximalwerte liegen meist etwas über, seltener etwas unter denen der Normalkultur. Die Kurve fällt nach Erreichen des Maximums zunächst auch steil, dann aber allmählich ab. Oft läuft sie sogar bis zu 72 Std der Abszisse parallel (Abb. 2 und Tab. 2).

Während also in den Zellen der Normalkultur schon nach etwa 12 Std nur noch wenige kleine Granula in den Zellen vorhanden sind, können unter THFA-Einfluß längere Zeit die großen und zahlreichen Granula beobachtet werden. Gelegentlich erfolgt auch in der THFA-Kultur ein steiler Abfall und dann ein Wiederanstieg der Granulazahl (Abb. 5). Das Wachstum ist gegenüber der Normalkultur zunächst verzögert, wird dann aber stärker, so daß nach 48 Std ebenfalls ein kräftiger Zuwachs zu beobachten ist.

Vergleicht man nun den Verlauf der Granulierung mit dem P-Gehalt (Abb. 4), so fällt auf, daß der Gesamt-P ebenfalls zunächst steil ansteigt und dann ganz allmählich abfällt. Die Werte sind im allgemeinen höher als in der Normalkultur. Einen besonders starken Anstieg zeigt der P-Gehalt der Fraktion 5. Während er in der Normalkultur meist unter 1,0 mg P/100 mg Trockensubstanz liegt, erreicht er diesen Wert in der THFA-Kultur schon nach 1 Std und schwankt dann zwischen 1,15 und 1,5 mg P. Der Verlauf der Kurven für Granulierung und Fraktion 3 ist gleichsinnig: steiler Anstieg und dann allmählicher Abfall. Der Einsattelung der Kurve der Fraktion 3 nach 5 Std entspricht ein Maximum des kalten TCE-Extraktes. Summiert man die Werte für Fraktion 1 u. 3, so liegt das erhaltene Maximum (1,73 mg P) wie das der Granulabildung bei 5 Std. Nach 7 Std haben beide Fraktionen zusammen noch den gleichen P-Gehalt (1,7 mg P), die Granulazahl ist schon abgefallen.

Die P-Gehalte im Rückstand (Fraktion 4) und im Alkohol-Ätherextrakt (Fraktion 2) zeigen, wie auch bei der Normalkultur, kaum Veränderungen.

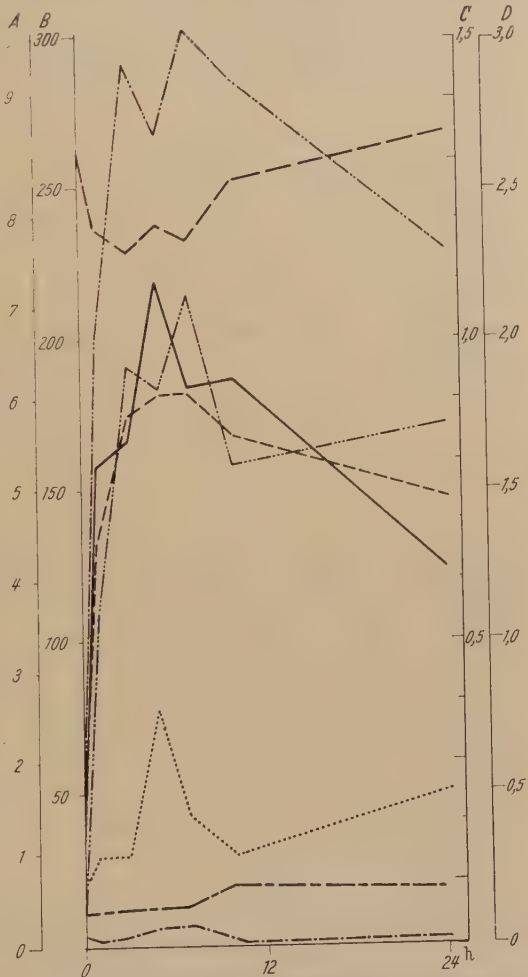


Abb. 4. *Mycobacterium phlei*. Granulabildung und Phosphorgehalt. Sauton + 0,7% THFA. Ordinaten: A Gesamt-N in mg/100 mg Trockensubstanz; B Gesamtzahl der Granula in 100 Bakterien; C P-Gehalt der Fraktionen in mg P/100 mg Trockensubstanz; D Gesamt-P des Bakterienmaterials in mg P/100 mg Trockensubstanz. — Granula/100 Bakterien; — — — Gesamt-N; - - - - Gesamt-P; ····· Fraktion 1; — · — · — Fraktion 2; — · — · — Fraktion 3; — — — — Fraktion 4

Nach den Untersuchungen von WINDER u. DENNENY (1957) haben auch andere Substanzen als THFA einen stimulierenden Effekt auf die Polyphosphatbildung. Sie wurden allerdings in verschiedenen Konzentrationen angewandt, so daß sich die Ergebnisse nicht ohne weiteres miteinander vergleichen lassen. Einen ähnlichen Effekt wie THFA hatten

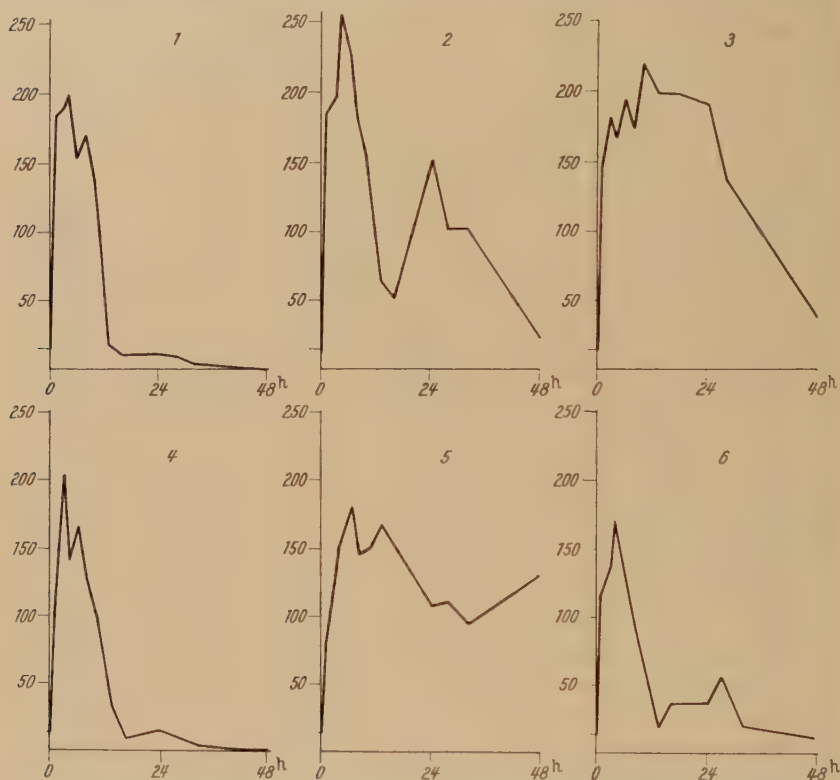


Abb. 5. *Mycobacterium phlei*. Granulabildung. Ordinate: Gesamtzahl der Granula in 100 Bakterien. Nährlösung: 1 Sauton, 2 Sn THFA, 3 Sn + THF, 4 Sn + Methanol, 5 Sn + Butanol, 6 Sn + Isopropanol. Alle Zusätze hatten eine Konzentration von $7 \cdot 10^{-2}$ mol

Tetrahydrofuran und Butanol; Äthanol war nur etwa $\frac{1}{3}$ so wirksam. In Abb. 5 ist eine Versuchsreihe wiedergegeben, bei der verschiedene Alkohole in gleicher molarer Konzentration zur Nährlösung zugesetzt wurden. Die Normalkultur (1) zeigt den üblichen steilen Abfall nach etwa 10 Std und dann ein langsames Ausklingen der Granulierung. THFA, THF und Butanol haben einen stimulierenden Effekt auf Stärke und Dauer der Granulabildung. Dagegen verhalten sich die Ansätze mit Methanol bzw. Isopropanol wie die Normalkultur. In den Kolben mit Zusätzen von THF und Butanol fand kaum eine Vermehrung der

Bakterien statt, die übrigen Kolben zeigten dagegen ein der Normalkultur entsprechendes Wachstum. Unter den gegebenen Bedingungen verzögern Butanol und THF also den Abbau der metachromatischen Granula, THFA dagegen fördert die Granulaneubildung in der wachsenden Kultur; Tab. 3 zeigt, daß THFA parallel der Erhöhung der Granulazahl einen merklichen Anstieg des Gesamt-P verursacht.

Diskussion

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß in Zellen von *M. phlei* innerhalb von etwa 3 Std eine sehr starke Granulabildung erfolgen kann, wenn für geeignete Stoffwechselbedingungen gesorgt wird.

Als vorteilhaft erwies sich die Schüttelkultur, weil sie einen intensiven Stoffaustausch und eine gute Belüftung begünstigt, und eine Vorkultur auf Agar, weil dann die Bakterien sich nicht zu Klumpen zusammenballen. Parallel der Granulavermehrung läuft eine Zunahme des Gesamt-P-Gehaltes und verschiedener P-Fractionen. Besonders ausgeprägt ist die Erhöhung der in heißer Perchlorsäure löslichen P-Verbindung. Chromatographische Untersuchungen haben ergeben, daß der weitaus größte Teil der in *M. phlei* enthaltenen kondensierten Phosphate sich nicht in kalter TCE lösen läßt, sondern bei der analytischen Aufarbeitung in den heißen Perchlorsäureextrakt (Fraktion 3) geht. In dieser Fraktion müssen nach den Erfahrungen der Literatur (IWAMURA 1955) auch die Nucleinsäuren enthalten sein. Fraktion 3 enthält also als Hauptbestandteile den Nucleinsäure-P und den Polyphosphat-P. Über die quantitative Verteilung beider Verbindungen kann noch nichts ausgesagt werden. Da sowohl die Bestimmung der Zucker (Ribose und Desoxyribose) wie auch der Basen (UV-Absorption) in den genannten Extrakten mit relativ großen Fehlern behaftet sein dürfte, wurde vorläufig auf eine quantitative Ermittlung verzichtet.

Wie die Ergebnisse zeigen, wird vom Ausgangswert bis zum Erreichen des Granulamaximums die Zahl der Granula etwa um den Faktor 4 bis 10 vervielfacht. Berücksichtigt man, daß die Granula während dieser Zeit ihren Durchmesser noch vergrößern, so ergibt sich eine außerordentliche Zunahme an Granulasubstanz. Obwohl auch in der Fraktion 3 der P-Gehalt stark ansteigt (maximal etwa um das 5fache), entspricht

Tabelle 3. *Mycobacterium phlei*. P-Gehalt nach 24 stündiger Bebrütung auf dem Schütteltisch im Submersverfahren bei 37° C.

Beimpft mit Material aus Flüssigkeitskulturen. Die angegebenen P-Werte beziehen sich auf 100 mg Bakterientrockensubstanz.

Nährboden	P-Gehalt
Sn	1,411 mg P
Sn + 6 · 10 ⁻² mol THFA	2,546
Sn + 6 · 10 ⁻² mol THF	1,733
Sn + 3 · 10 ⁻² mol THF	
+ 3 · 10 ⁻² mol Methanol	1,358
Sn + 6 · 10 ⁻² mol Methanol	1,699

dieser Zuwachs meist nicht der Erhöhung der Granulamasse. Eine denkbare Erklärung für diese Diskrepanz wäre die Bildung von lichtmikroskopisch sichtbaren Granula aus submikroskopischen Mikrogranula. Da aber nach Untersuchungen von SHINOHARA (1957) das Verhältnis von Mikro- zu Makrogranula während des Wachstums etwa gleich bleibt, scheidet diese Erklärungsmöglichkeit aus. Es muß also noch offen bleiben, welche Faktoren außer der Akkumulation von kondensierten Phosphaten die starke Granulierung bedingen.

Bemerkenswert erscheint auch noch, ohne daß zunächst eine Erklärung dafür gegeben werden soll, daß die Kurve der Fraktion 3 im Maximum eine Einsattelung erfährt, der eine Zunahme in Fraktion 1, also dem säurelöslichen P entspricht.

Zusammenfassung

In wachsenden Kulturen von *Mycobacterium phlei* erfolgt die Bildung metachromatischer Granula am raschesten in geschüttelten Submerskulturen, wenn zum Beimpfen Material von Agarkulturen verwendet wird.

Innerhalb weniger Stunden wird die Granulazahl um das 4—12fache gesteigert.

Der Erhöhung der Granulazahl entspricht eine Zunahme der „säureunlöslichen“ Phosphorverbindungen, die im wesentlichen aus Polyphosphaten und Nucleinsäuren bestehen dürften.

Tetrahydrofurfurylalkohol stimuliert die Granulabildung und verhindert ein rasches Absinken der Granulazahl und der in heißer Perchlorsäure löslichen Phosphorverbindungen.

Literatur

DREWS, G.: Die granulären Einschlüsse der Mycobakterien. Arch. Mikrobiol. **28**, 369 (1958). — DUGUID, J. P., I. W. SMITH and J. F. WILKINSON: Volutin production in *Bacterium aerogenes* due to development of an acid reaction. J. of Path. and Bact. **67**, 289 (1954).

GLAUERT, A. M., and E. M. BRIEGER: The electron dense bodies of *Mycobact. phlei*. J. gen. Microbiol. **13**, 310 (1955).

HOFFMANN-OSTENHOF, O., A. KLIMA, J. KENEDY u. K. KECK: Zur Kenntnis des Phosphatstoffwechsels der Hefe. Mh. Chem. (Wien) **86**, 604 (1955).

KNAPPE, E., G. DREWS u. V. BÜCKEL: Untersuchungen zum Phosphorstoffwechsel der Mycobakterien. Zbl. Bakt. II. Abt. im Druck.

LINDEGREEN, C. C.: The relation of metaphosphate formation to cell division in yeast. Exp. Cell. Res. **2**, 275 (1950).

MEISSNER, J., u. J. LEMKE: Über die Aufnahme P²³-markierter kondensierter Phosphate bei BCG und H37-Stämmen von *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Jahrb. Borstel 1954/55, 542. — MUDD, S.: Cytology of bacteria. Part I: The bacterial cell. Ann. Rev. Microbiol. **8**, 1 (1954). — MUDD, S., K. TAKEYA and H. J. HENDERSON: Electron-scattering granules and reducing sites in mycobacteria. J. Bact. **72**, 767 (1956).

RUSKA, H., G. BRINGMANN, I. NECKEL u. G. SCHUSTER: Über die Entwicklung sowie den morphologischen und zytochemischen Aufbau von *Mycobacterium avium*. Z. wiss. Mikr. **60**, 425 (1952).

SALL, T., S. MUDD and J. C. DAVIS: Factors conditioning the accumulation and disappearance of metaphosphate in cells of *Corynebacterium diphtheriae*. Arch. Biochem. biophys. **60**, 130 (1956). — SCHMIDT, G., L. HECHT and S. J. THANNHAUSER: The effect of potassium ions on the absorption of orthophosphate and the formation of metaphosphate by baker's yeast. J. biol. Chem. **178**, 733 (1949). — SHINOHARA, CH., K. ITO, K. FUKUSHI and J. SUZUZI: An electron microscopic study of tubercle bacilli. Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. **7**, 369 (1957). — SMITH, I. W., J. F. WILKINSON and J. P. DUGUID: Volution productin in *Aerobacter aerogenes* due to nutrient imbalance. J. Bact. **68**, 450 (1954).

WINDER, F. G., and J. M. DENNENY: The metabolism of inorganic polyphosphate in mycobacteria. J. gen. Microbiol. **17**, 573 (1957). — WINDER, F. G., and J. M. DENNENY: Phosphorus metabolism of mycobacteria: determination of phosphorus compounds in some mycobacteria. J. gen. Microbiol. **15**, 1 (1956). — WINKLER, A.: The metachromatic granula of bacteria. Symposium Bact. Cytol. 6. Int. Congr. of Microbiol. Rom 1953.

(Aus dem Staatsinstitut für allgemeine Botanik und Botanischer Garten, Hamburg)

Die Carotinoide von *Mutinus caninus* Huds.*

Von

HORST ENGEL und INGBORG FRIEDERICHSEN

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 30. März 1958)

Das Receptaculum von *Mutinus caninus*, der Hundsruete, besitzt eine blaß gelblichrote Farbe, die unter der Gleba in ein auffallendes Orange-rot übergeht. Über die chemische Natur und die Bedeutung des Farbstoffes liegen bisher keine Angaben vor. Unter den nahe verwandten Clathraceen der Subtropen und Tropen sind zwar leuchtend rote Farben nicht selten; von diesen Pilzen ist aber bisher nur *Anthurus aseroëformis*, der seit einigen Jahren auch in Süddeutschland auftritt, untersucht worden. EGLE (1950) stellte fest, daß das rote Pigment im wesentlichen aus Lycopin besteht. Die Vermutung lag daher nahe, daß auch die Farbe von *Mutinus* auf Carotinoide zurückgeht.

Der Pilz ist in den Wäldern um Hamburg nicht selten anzutreffen. Besonders reichlich trat er im Herbst 1957 im Sachsenwalde auf, so daß es möglich war, eine größere Anzahl Fruchtkörper zu sammeln. Schon im Herbst 1956 hatten wir ihn auf verschiedenen Exkursionen gefunden, anschließend untersucht und Carotinoide festgestellt.

Gewinnung des Rohextraktes. Das Untersuchungsverfahren wurde von vornherein auf Carotinoide abgestellt. Die Fruchtkörper wurden entweder frisch oder nach dem Trocknen an der Luft aufgearbeitet. Nach zahlreichen Voruntersuchungen erwies sich das folgende Verfahren als besonders geeignet. Das lufttrockene Material wurde mit etwas Sand fein zerrieben, in einem Erlenmeyer mit Aceton + Methanol (1:1) übergossen und unter N_2 über Nacht stehen gelassen. Frisches Material wurde mit Sand und wasserfreiem Na_2SO_4 zerrieben. Am anderen Tag wurde die tief goldgelbe Lösung abdekantiert und der Rückstand so oft mit frischem Lösungsmittel behandelt, bis kein Farbstoff mehr in Lösung ging. Das war in der Regel nach 3 Extraktionen der Fall.

Die vereinigten Extrakte wurden mit Petroläther unter Zusatz von H_2O ausgeschüttelt. Hierbei ging weitaus der größte Teil des Farbstoffes in den Petroläther über. Die schwach gelb gefärbte wäßrige Phase wurde mit Essigsäure angesäuert und erneut mit Petroläther ausgeschüttelt. Auf diese Weise konnten jedoch die Farbstoffreste darin nur zum Teil herausgeholt werden. Das nicht in Petroläther Überführbare wurde nicht weiter untersucht.

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. AUGUST RIFFEL zum 70. Geburtstag.

Nach mehrmaligem Waschen der Petrolätherschicht mit H_2O wurde diese im N_2 -Strom unter vermindertem Druck bis auf wenige Milliliter eingeengt, zur Verseifung mit 12%iger methanolischer KOH versetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Tags darauf wurde so lange H_2O zugegeben, bis 2 Schichten entstanden. Der weitaus größte Teil des Farbstoffes ging dabei in die Epiphase. Die untere alkoholische Lösung wurde nochmals ausgeschüttelt, ohne daß es gelang, die letzten, blaß gelblichen Farbstoffreste daraus zu entfernen. Auch nach Ansäuern mit Essigsäure und Ausschütteln blieben Spuren davon zurück. Auf diese geringen Mengen hypophasischer Farbstoffe wurde nicht weiter geachtet. Nach gründlichem Waschen der vereinigten petrolätherischen Lösungen und Trocknen mit Na_2SO_4 wurde auf wenige Milliliter eingeengt. Diese Rohlösung diente zur chromatographischen Untersuchung.

Trennung des Farbstoffgemisches

Eine kleine Menge der konzentrierten Rohlösung wurde auf den Startpunkt eines Rundfilters ($\varnothing$ 30 cm, Schleicher u. Schüll Nr. 2043 b) gebracht und im Rundfilter-Entwickler (Nr. 330 DESAGA Heidelberg) entwickelt. Als Lösungsmittel bewährte sich besonders Petroleum-Benzin (Merck Nr. 1774, Siedebereich $60-80^\circ C$), doch waren auch Petroläther oder Hexan geeignet. Der Zulauf des Benzins zum Startfleck erfolgte durch das mit Zellulosepulver gefüllte Pipettenrohr des Entwicklers. Vorprüfungen hatten gezeigt, daß es nicht ratsam ist, die Rohlösung auf die Zellulosesäule zu geben und dort eine Vortrennung herbeizuführen, wie es die Vorschrift verlangt. Die Zellulose hielt gewisse Farbstoffreste hartnäckig zurück.

Während der Entwicklung bildeten sich mindestens 6 Farbzonen verschiedener Stärke und Farbe, wodurch offenkundig wurde, daß mehrere Farbstoffe vorlagen. Fast unmittelbar hinter dem Benzin wanderte in relativ beträchtlicher Menge ein dottergelber Farbstoff mit scharf abgesetzter Front, den wir Farbstoff 1 nennen wollen. In immer größer werdendem Abstand folgte in noch größerer Menge eine breite, lachsfarbene, ziemlich unscharfe Zone, die als Farbstoff 2 bezeichnet werden soll. Zwischen beiden Farbstoffen entwickelten sich regelmäßig zwei weitere, sehr schwache, gelblich-rötliche Zonen, die außer acht gelassen wurden.

Zwischen Farbstoff 2 und dem Startfleck entstanden ebenfalls noch 2—3 schwache Zonen, von denen die am langsamsten wandernde durch ihre weinrote Farbe auffiel. Der Menge nach blieben jedoch auch diese Begleitpigmente weit hinter den Farbstoffen 1 und 2 zurück, so daß wir sie nicht weiter untersucht haben. Der Startfleck blieb in allen Fällen schmutzig gelb. Es lagen somit 2 Hauptfarbstoffe vor, denen allein unsere weitere Aufmerksamkeit galt.

Die aus verschiedenen Chromatogrammen stammenden Zonen 1 wurden mit wenig Aceton eluiert, der Farbstoff in Petroläther überführt, zur Trockne eingeengt, in Benzin aufgenommen und erneut chromatographiert.

Dabei blieben Spuren rötlicher Pigmente hinter der dottergelben Zone zurück und wurden entfernt. Der so gereinigte Farbstoff wurde — noch am Papier haftend — für die spätere spektralphotometrische Untersuchung unter N_2 im Eisschrank aufgehoben.

Auch die Zonen 2 wurden mit Aceton aus dem Papier gelöst, der Farbstoff in Petroläther überführt und erneut im Rundfilterentwickler mit Benzin chromatographiert. Spuren von beigemengten Farbstoffen, die schneller wanderten, konnten auf diese Weise entfernt werden.

Wurde der Rohextrakt im unverseiften Zustand chromatographiert, änderte sich die Art der Aufteilung des Farbstoffgemisches nicht. Die Verseifung hatte nur insofern einen Einfluß, als die Farbzonen auf dem Papier schärfer hervortraten. Die spätere spektralphotometrische Untersuchung zeigte, daß auch die Lage der Absorptionsmaxima durch die Verseifung keine Veränderung erfuhr.

Auch war es gleichgültig, ob die Fruchtkörper frisch oder getrocknet verarbeitet wurden. Ebenso lieferten die 1956 und 1957 gesammelten Pilze die gleichen Chromatogramme. Mehrfach wurden frische „Hexeneier“ des Pilzes in der feuchten Kammer zum Ausschlüpfen gebracht. Auch diese Exemplare gaben stets das gleiche Bild: Die Farbstoffe 1 und 2 waren bei weitem vorherrschend. Lediglich die schwachen Zwischenzonen wechselten ein wenig in ihrer Intensität oder Zahl.

Die Rohlösung des Farbstoffs wurde auch säulenchromatographisch untersucht. Zu dem Zweck wurde eine kleine Menge des Rohextraktes auf eine Säule aus Aluminiumoxyd (Merck Nr. 1097) gegeben und mit Hexan + 2% Aceton laufen gelassen. Am schnellsten wanderte auch jetzt eine dottergelbe, sehr schmale Farbfront, der in immer größer werdendem Abstand eine breite, lachsfarbene, ziemlich diffuse Zone folgte. Zwischenzonen waren meistens nicht sicher auszumachen. Die Entwicklung wurde solange fortgesetzt, bis Zone 1 vollständig durchgelaufen war. Die schön gelbe Lösung wurde gewaschen, getrocknet, und unter N_2 im Eisschrank für die spätere Untersuchung aufgehoben.

Die lachsfarbene Zone wurde mechanisch aus der Al-Säule entfernt, zur Eluierung mit Aceton versetzt und der Farbstoff in Hexan überführt, in dem er nur mäßig löslich ist. Die Lösung wurde erneut auf die Säule gegeben, doch es trat keine weitere Aufgliederung ein.

Das spektralphotometrische Verhalten der Farbstoffe 1 und 2

Die Untersuchung wurde mit dem Zeiß-Spektralphotometer PMQ II vorgenommen. Sie lieferte die in Abb. 1 gebrachten Absorptionskurven. Ihre Form zeigt, daß wir es — wie schon vermutet — mit Carotinoiden zu tun haben. Die Absorptionsmaxima von Farbstoff 1 lagen bei etwa 425 (unscharf), 449/50 und 479 $m\mu$. Das gleiche Absorptionsverhalten zeigte der säulenchromatographisch gewonnene dottergelbe Farbstoff.

Beide waren identisch, denn auch ihre gemischten Lösungen wanderten bei erneuter Chromatographierung im Rundfilter-Entwickler mit gemeinsamer Front.

Das Absorptionsverhalten von Farbstoff 1 weist auf β -Carotin hin. Nach den Angaben von KARRER u. JUCKER (1948) sowie GOODWIN (1955) liegen dessen Maxima bei 425, 451 und 482 $m\mu$. Die geringen Abweichungen mögen auf Verunreinigungen beruhen. Die Substanzmengen waren zu gering, als daß sie eine weitere Reinigung erlaubt hätten. Aber auch das Absorptionsverhalten in Schwefelkohlenstoff sprach für β -Carotin. Die Maxima der zwiebelroten Lösung lagen bei ~ 450 , 483/84 und $\sim 520 m\mu$ (Literatur: 450, 485 u. 520 $m\mu$). Auch die Form der Kurve entspricht der des β -Carotins.

Die sehr gut ausgebildeten Absorptionsmaxima von Farbstoff 2 lagen bei 444/45, 471/72 und 503/4 $m\mu$. Zahlreiche weitere Messungen lieferten stets die gleiche Kurve mit nur geringfügigen Schwankungen in der Lage der Maxima. Auch der säulenchromatographisch gewonnene lachsrote Farbstoff ergab das gleiche Bild. Zusammen mit dem papierchromatographisch gewonnenen roten Farbstoff im Rundfilter-Entwickler chromatographiert, trennten sich beide nicht. Sie waren offensichtlich identisch.

Der Vergleich mit dem Absorptionsverhalten bekannter Carotinoide zeigt, daß wir es mit Lycopin zu tun haben, dessen Maxima in Petroläther nach den Literaturangaben bei 446, 474 und 506 $m\mu$ liegen. Auch die Form der Kurve mit ihren besonders gut ausgeprägten längerwelligen Gipfeln entspricht völlig der des Lycopins. Die Absorptionsmaxima in Schwefelkohlenstoff lagen bei 476/77, 506/7 und 544 $m\mu$ (Literatur: 477,

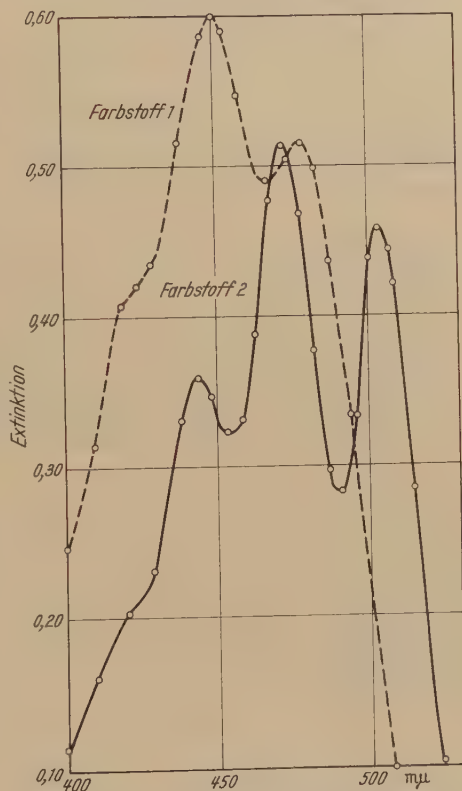


Abb. 1. *Mutinus caninus*. Absorptionskurven der Farbstoffe 1 und 2 in Hexan. Maxima Farbstoff 1 425, 449/50 und 477/79 $m\mu$; Maxima Farbstoff 2 444/45, 471/72 und 503/4 $m\mu$

507 u. 547 $m\mu$), in Chloroform bei 455/56, 482/83 und 517 $m\mu$ (Literatur: 456, 485 u. 520 $m\mu$), in Äthanol bei 446, 472 und 503 $m\mu$ (Literatur: 443, 472 u. 503 $m\mu$). Danach besteht kein Zweifel, daß wir es mit Lycopin zu tun haben. Die nahe Verwandtschaft von *Mutinus* und *Anthurus* scheint somit auch im gemeinsamen Besitz von Lycopin als dem Hauptpigment zum Ausdruck zu kommen.

Zusammenfassung

Der rötliche Farbstoff der Fruchtkörper von *Mutinus caninus* besteht in der Hauptsache aus 2 Carotinoiden: β -Carotin und vor allem Lycopin. In geringer Menge kommen daneben noch andere Carotinoide vor, die aber einstweilen nicht untersucht wurden.

Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Wir danken Fräulein H. WACHENFELD für wertvolle Hilfeleistung bei den Untersuchungen.

Literatur

- EGLE, K.: Über das Pigment von *Anthurus aseroëformis* MacAlpine. *Planta* **38**, 233—243 (1950). — GOODWIN, T. W.: Carotinoids, in: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, 3, 272—311. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — KARRER, P., u. E. JUCKER: Carotinoide. Basel: Birkhäuser 1948.

(Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium der Firma Henkel & Cie. GmbH.,
Düsseldorf)

Über einige Wirkungen hoher Konzentrationen anionischer grenzflächenaktiver Substanzen auf Bakterien

Von
WILHELM K. FISCHER*

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. Mai 1958)

Die synthetischen grenzflächenaktiven Substanzen haben als Netz-, Reinigungs- und Emulgiermittel u. a. auf vielen praktischen Anwendungsgebieten große Verbreitung und wirtschaftliche Bedeutung erlangt. In gleichem Maße ist auch das Interesse an diesen Stoffen im Zusammenhang mit mikrobiologischen Problemen gewachsen; und besonders hat auch ihre bakterio-statische und baktericide Wirkung Beachtung gefunden.

Viele der kationaktiven und amphoterer Substanzen haben durch eine ausgesprochene bakterio-statische und baktericide Wirkung in niedrigen Konzentrationen den Charakter guter Desinfektionsmittel, während die nichtionogenen Stoffe in dieser Hinsicht praktisch inert sind. Ein allgemeiner Überblick über die Eigenschaften und prinzipiellen Wirkungsweisen der verschiedenen Gruppen von wasserlöslichen grenzflächenaktiven Substanzen auf Mikroorganismen findet sich bei H. DAMM (1956). Von BOLLE (1957) wird z. B. zum Unterschied zur baktericiden, lytischen und koagulierenden Wirkung der kationaktiven Substanzen für Dodecylsulfat und Alkylbenzolsulfonat keine koagulierende, keine oder nur schwach baktericide und nur eine verkappte, schwach lytische Wirkung angegeben.

Bei den anionischen grenzflächenaktiven (waschaktiven) Substanzen (WAS) ist demgegenüber eine entsprechende baktericide Wirkung nicht ausgeprägt oder erst bei relativ sehr hohen Konzentrationen feststellbar. Jedenfalls liegen die wirksamen Konzentrationen der WAS vor allem gegenüber den besonders resistenten gramnegativen Bakterien in einer ganz anderen um mehrere Potenzen erhöhten Größenordnung als bei den üblichen Desinfektionsmitteln. Selbst die relativ größere bakterio-statische Wirkung gegenüber den grampositiven Bakterien ist an sich noch als Desinfektionswirkung uninteressant.

Das mag auch der Grund sein, warum gerade die anionischen WAS, als wirtschaftlich wichtigste Gruppe, abgesehen von den in der mikrobiologischen Technik in vielen Abwandlungen benutzten Methoden für die

* Herrn Prof. Dr. AUGUST RIPPEL-BALDES zum 70. Geburtstage gewidmet.

Selektivkultur der gramnegativen Bakterien, bisher nicht in dem gleichen Maße wie die anderen Gruppen der WAS mikrobiologisch betrachtet wurden, obwohl hier insbesondere in den ausgeprägt spezifischen Resistenzunterschieden verschiedener Bakteriengruppen ein echtes Wirkungsphänomen vorliegt. Hier könnten Einblicke zweifellos in tiefere Zusammenhänge des Aufbaus der Zelle und des Bakterienstoffwechsels hineinführen.

Einige spezifische Wirkungen auf Enzymreaktionen sind neuerdings bekannt geworden. Nach WILLS (1955), KATAGIRI u. IKEMIYA (1957) verhindern anionaktive WAS in hohen Konzentrationen die enzymatische Hydrolyse des Trioieins und hemmen α - und β -Amylase. KETON (1958) fand, daß anionaktive WAS in bestimmter Konzentration latente Phenoloxydase aktivierten, während kationaktive und nichtionogene WAS unwirksam sind.

Wir möchten darum hier einige Beobachtungen mitteilen, die für die Kenntnis der Wirkungsweise der anionaktiven WAS auf die Bakterienzelle interessant sind.

Methoden. Abkürzungen: In dieser Arbeit bezeichnet WAS allgemein die anionischen grenzflächenaktiven Substanzen. FAS = Fettalkoholsulfat, Mol-Gewicht 288. ABS = Alkylbenzolsulfonat, mittleres Mol-Gewicht 348. Für WAS werden immer die Verdünnungskonzentrationen angegeben, z. B. 10^{-3} ABS = 1 g/l = $2,82 \cdot 10^{-3}$ mol oder 10^{-3} FAS = $3,4 \cdot 10^{-3}$ mol.

Testbakterien: *Mycobacterium phlei*, Stamm Göttingen (= G), *Mycobacterium phlei* vom Robert-Koch-Institut in Berlin (= B), *Proteus vulgaris* (Prot.), *Staphylococcus aureus* (St.aur.).

Anzucht: *M. phlei* G und B auf Dextrosebouillon-Agar (DBA), wenn nicht anders angegeben bei 37°C. Andere Nährböden: Bouillon-Agar (BA) oder Glycerin-Bouillon-Agar (GBA) mit 0,5–3% Glycerin. Für die Versuche wurden die Zellen in destilliertem Wasser suspendiert und 3fach über Membranfiltern gewaschen und anschließend im Kühlschrank bei 6°C für die Versuche vorbereitet. Diese langsame Verarmung an Reservestoffen führte zu nur wenig geschädigten Zellen mit gleichmäßigerem, reduziertem Stoffwechsel als die übliche mehrstündige Belüftung.

Die Messung der O₂-Aufnahme (hier kurz und nicht ganz zutreffend oft Atmung genannt) erfolgte im Warburgapparat in 15 ml-Kegelgefäßen bei 38°C in m/20 Phosphatpuffer pH 7, für pH-Kontrollen auch pH 6,8 und 7,17 und mit Zusätzen wie 0,5 % Glukose, 0,1 % Ammoniumsulfat, 10⁰ DB oder DB allein. QO₂ (hier als

Atmungsquotient bezeichnet) = $\frac{X}{m \cdot t}$ ($X = \text{O}_2$ in mm³, m = Trockenmasse in mg,

t = Zeit in Stunden). Als Maßstab für die unterschiedliche Einwirkung von WAS wurde zumeist die prozentuale Restatmung verglichen, bezogen auf die normale Atmung ohne WAS-Zusatz ($Q_{O_2} = 100\%$).

Die Bestimmung der Katalaseaktivität erfolgte manometrisch nach FUJITA u.

KODAMA (1931). Der Katalasequotient $Q_{\text{Kat.}} = \frac{\text{mm}^3 \text{O}_2 \text{ in } 30'}{\text{TM in mg}}$

(Temperatur 38°C, H₂O₂-Konzentration im Spaltansatz 0,01 m). Die Spaltung darf höchstens 50% betragen. Bestimmungsfehler $\pm 3\%$ für dieselbe Suspension und maximal 20% für Suspensionen aus verschiedenen Kulturansätzen und Aufarbeitungen.

Versuche

I. Resistenzunterschiede gramnegativer und grampositiver Bakterien gegenüber WAS, gemessen an der Hemmung der O₂-Aufnahme

Die manometrische Messung der O₂-Aufnahme in der Warburgapparatur ist trotz gewisser substanzbedingter methodischer Schwierigkeiten ein feiner Maßstab für die WAS-Wirkung auf die Testbakterien. Beim Vergleich von Resistenzunterschieden ist nun aber besonders störend, daß neben den sehr abweichenden Wachstumsanforderungen der einzelnen Bakterienspezies diese eine ganz verschieden große spezifische Atmungsaktivität besitzen. So fanden wir z. B. vergleichsweise in unseren Versuchen optimal in DB für *Proteus* $Q_{O_2} = 1260$, *St.aur.* = 640 und *M.phlei* G und $B = 245$ und 260. Noch weiter gehen die Q_{O_2} auseinander (Abb.3), wenn man z. B. die Resistenzunterschiede ruhender Zellen mit solchen Zellen vergleicht, die mit C-Quelle, aber ohne zusätzliche N-Quelle betriebsstoffwechseln. Das Bild der Wirkungen der WAS wird dann sehr unübersichtlich. Außerdem ist die Art der Vorbereitung der Zellen sehr wichtig, damit man eine gleichmäßige Ausgangsbasis für die Versuche erhält (siehe Methodik). Zur Kennzeichnung der grundsätzlichen Wirkungsunterschiede haben wir die prozentualen Verhältnisse der O₂-Aufnahme mit und ohne WAS dargestellt, indem wir die Q_{O_2} direkt vergleichbarer Suspensionen gleich 100 setzen und die Veränderung der Q_{O_2} nach WAS-Einwirkung in Beziehung dazu bringen.

In Vorversuchen hatten wir gefunden, daß die im Zeitraum von 180—240 min nach Versuchsbeginn (Zusatz WAS) gemessenen Werte die klarsten Verhältnisse bieten. Eine Eigenart der anionaktiven WAS ist nämlich, daß die Einwirkung auf die Atmung relativ langsam eintritt und anders verläuft als bei typisch baktericiden Substanzen oder Atmungsgiften. Ein wesentlicher Versuchsfaktor ist die Dichte der Suspensionen. Als maximale Grenze fanden wir etwa 5 mg TM/ml. Zumeist wurde mit 0,5—3 mg TM/ml gearbeitet (Abb.7).

Ein Beispiel für diese Darstellungsweise gibt Abb.1. Ganz unabhängig von den sehr verschiedenen optimalen Atmungsquotienten von *Prot.*, *St.aur.* und *M.phlei* G ist durch die prozentuale Darstellung der prinzipielle gruppenspezifische Unterschied des gramnegativen *Prot.vulg.* gegenüber *St.aur.* und *M.phlei* sichtbar, wobei besonders auffällt, daß die Kurven für *St.aur.* und *M.phlei* nahezu gleich laufen. Das ließ sich in unabhängigen Versuchsreihen mit verschiedenen Suspensionen stets in annähernd gleicher Weise reproduzieren, ebenso mit anderen Testbakterien, wie *E.coli*, *Ps.fluorescens* u. a., die aus Raumgründen hier nicht behandelt werden können.

Die Versuche der Abb.1 zeigen, daß in optimaler Nährlösung mit maximal atmenden und wachsenden Zellen im Bereiche der gerade auf die Atmung wirksam werdenden Konzentrationen der WAS die Resistenzdifferenz etwa 2 Potenzen beträgt. Es ist verständlich, daß hier in

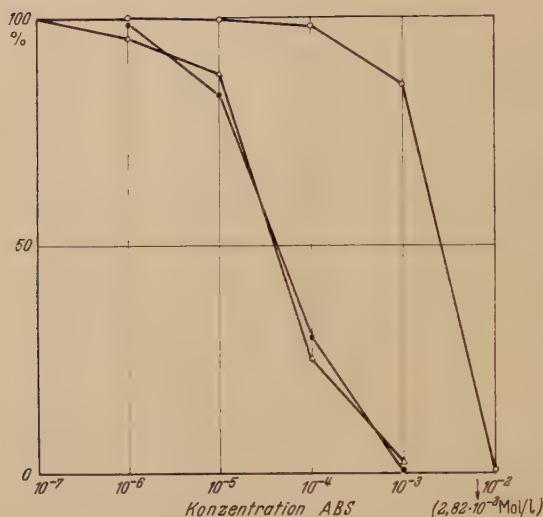


Abb. 1. Prozentuale Verhältnisse der O_2 -Aufnahme (Q_{O_2}) bezogen auf gleiche Suspensionen ohne ABS = 100% in Dextrose-Bouillon bei 38° C, Meß-Zeiten 180–240 min nach Zusatz. ○—○ *Proteus vulgaris*, ●—● *Staph. aureus*, Δ—Δ *Mycobact. phlei* (G)

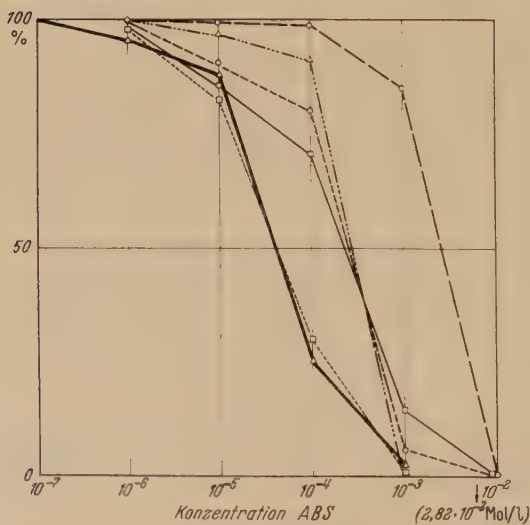


Abb. 2. Entsprechend Abb. 1. ○—○ *Proteus vulgaris* in Dextrosebouillon, ○—○ *Proteus vulgaris* in m/20 Puffer + Glucose, □—□ *Staph. aureus* in Dextrosebouillon, □—□ *Staph. aureus* in m/20 Puffer + Glucose, Δ—Δ *Myc. phlei* G. in Dextrosebouillon, Δ—Δ *Myc. phlei* G. in m/20 Puffer + Glucose

optimaler Nährlösung mit maximalem Q_{O_2} in jedem Fall bei Einwirkung von WAS die Werte der O_2 -Aufnahme 100% oder weniger sein müssen. Bei *Prot.* ist die Atmung bei der hohen Konzentration von 10^{-4} noch ungestört und sogar bei 10^{-3} sind noch 85% der Normalatmung vorhanden.

Von größerem Interesse ist nun die Beobachtung (Abb. 2), daß die Verhältnisse bei nur betriebsstoffwechselnden Zellen wesentlich anders liegen. Mißt man die O_2 -Aufnahme von Zellen wie vorher in m/20 Phosphatpuffer mit Glucose als alleiniger C-Quelle, so kann in den Reservestoff-verarmten Zellen ohne weitere N-Quelle keine wesentliche Zellvermehrung eintreten und die gegenüber ruhenden Zellen erhöhte O_2 -Aufnahme steht in erster Linie im Zeichen einer Betriebsstoffwechselleistung. Es zeigt sich nun überraschend, daß der Betriebsstoffwechsel von *Prot.* als Beispiel für die gramnegativen Bakterien, prozentual und damit relativ viel weniger resistent ist als der Bau- und

Vermehrungsstoffwechsel in DB. Bei *St. aur.* und *M. phlei* ist es dagegen umgekehrt, indem der Betriebsstoffwechsel prozentual viel weniger gehemmt wird als der Baustoffwechsel.

Für *M. phlei* G ist diese Erscheinung in den Versuchen der Abb. 3 weiter erläutert. Hier ist außerdem noch die Einwirkung auf Zellen verglichen, die sich in einem Medium aus m/20 Phosphatpuffer, Glucose und $\text{NH}_3\text{-N}$ vermehren können. Der Q_{O_2} (100%) = 146 liegt dabei zwischen dem optimalen Wert 245 in DB und dem Wert $Q_{O_2} = 46$ für betriebsstoffwechselnde Zellen in m/20 Puffer mit Glucose. Es zeigt sich also auch hier für *M. phlei* G die abgestufte Zunahme der Empfindlichkeit beim Übergang vom Betriebs- auf den Baustoffwechsel wie bei *St. aur.* und damit prinzipiell umgekehrt zu *Prot.* Das ist besonders deutlich für die Konzentration 10^{-4} . Dazu sind in Abb. 4 direkt vergleichbare Versuche mit FAS wiedergegeben, und auch hier ist das prinzipielle Verhalten gleichermaßen.

In Abb. 3 und 4 ist außerdem die Wirkung von ABS und FAS in m/20 Phosphatpuffer auf *M. phlei* G-Zellen mit reduzierter endogener Atmung ($Q_{O_2} = 5,5$, in anderen Versuchen auch $Q_{O_2} = 1,1$) dargestellt, und es zeigt sich, daß bei ABS und FAS bei Konzentrationen von 10^{-6} und 10^{-5} eine etwa gleich große prozentuale Förderung der O_2 -Aufnahme erfolgt. Die Größenordnung der prozentualen Hemmung durch ABS bei 10^{-4} paßt andererseits vollkommen in das vorher besprochene Wirkungsprinzip bei den untersuchten grampositiven Bakterien, einschließlich *M. phlei*, daß auf der Linie von den ruhenden über betriebsstoffwechselnde und optimal baustoffwechselnde Zellen die prozentuale Hemmung der Atmung zunimmt, im Gegensatz zur größeren Resistenz des Baustoffwechsels gegenüber dem Betriebsstoffwechsel bei den gramnegativen Bakterien. Hier bietet sich zweifellos einer der möglichen Ansatzpunkte

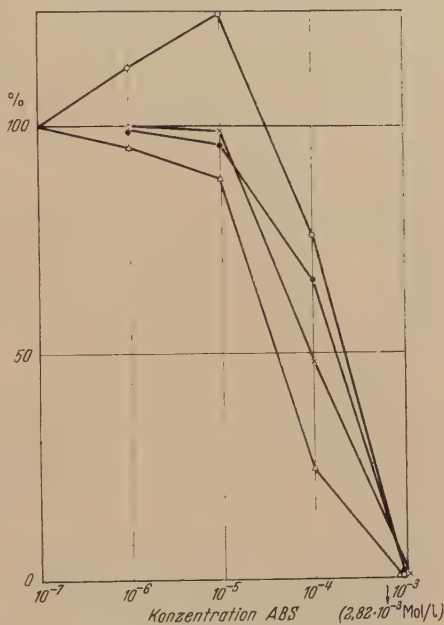


Abb. 3. *Myc. phlei* G. Prozentualer Vergleich der O_2 -Aufnahme von Suspensionen gleicher Dichte ($TM = 1,46$ mg) in verschiedenen Lösungen. Meßzeit 180–240 min nach Zusatz von ABS, bezogen auf die entsprechende Kontrollatmung ohne Zusatz (100%).
 $\circ$ — $\circ$ m/20 Phosphatpuffer pH 7,0, ($Q_{O_2}/100\% = 5,5$) $\bullet$ — $\bullet$ m/20 Phosphatpuffer + Glucose, ($Q_{O_2}/100\% = 46,0$) $\times$ — $\times$ m/20 Phosphatpuffer + Glucose + $\text{NH}_3\text{-N}$, ($Q_{O_2}/100\% = 146,0$) $\triangle$ — $\triangle$ Dextrosebouillon ($Q_{O_2}/100\% = 245$)

zum Verständnis der hohen Selektivwirkung anionischer WAS auf gramnegative Bakterien.

Beim Vergleich der Wirkung von ABS und FAS auf *M. phlei* G-Zellen mit reduzierter endogener Atmung fällt bei FAS für die Konzentration

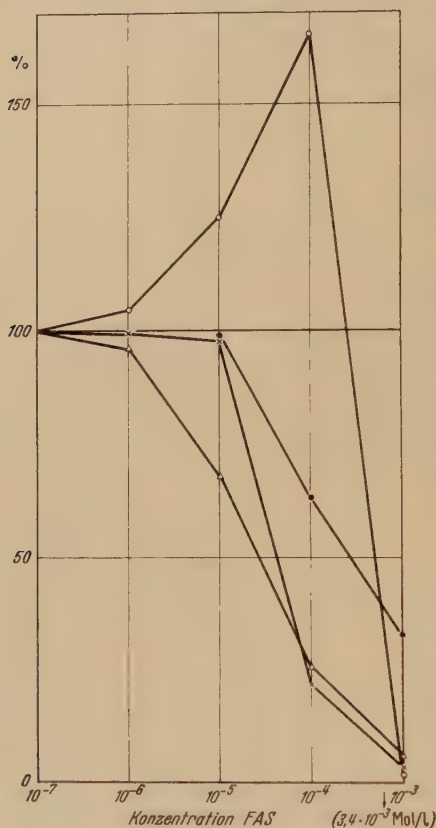


Abb. 4. Wie Abb. 3, aber FAS

10^{-4} in Abb. 4 die starke Erhöhung der O_2 -Aufnahme auf, während vergleichsweise bei ABS hier bereits eine depressive Wirkung vorliegt. Darüber gibt die Abb. 5 genauere Aufklärung. Bei Betrachtung allein der hohen Konzentrationen von 10^{-4} für ABS und FAS und vergleichsweise Glucose zeigt sich, daß die Atmungsförderung bei FAS in Abb. 4 auf einer Verwertung des FAS als C-Quelle zurückzuführen ist.

II. Die Grenzkonzentrationen für die Sistierung der O_2 -Aufnahme und für die Abtötung und Beziehungen zur kritischen Konzentration (c_k)

Die WAS-Grenzkonzentrationen für die völlige Sistierung der O_2 -Aufnahme in den Abb. 1—5 sind bei unseren Versuchsanordnungen für den gemessenen Zeitraum von 180—240 min nach Zusatz der WAS eng begrenzt und liegen im Bereiche um etwa 10^{-3} . Nur für die stark baustoffwechselnden Zellen von *Prot.* ist

die Grenzkonzentration wesentlich erhöht und liegt bei etwa 10^{-2} WAS und damit bei 1% igen Lösungen. In Abb. 4 bei Versuchen mit FAS ist auch für *M. phlei* G für den Betriebsstoffwechsel (Nährlösung mit Glucose) bei 10^{-3} eine deutliche prozentuale Resistenzverschiebung sichtbar, verursacht durch die analytisch meßbare schnelle Inaktivierung der WAS durch die Bakterien.

Diese Wirkungsgrenzen stimmen recht gut mit den wenigen vergleichbaren exakten Angaben in der Literatur überein. MINAMI (1956) fand bei Versuchen mit Oleat auf *Mycobacterium avium* Abtötung nach 30 min bei 10^{-3} mol und bei 10^{-4} mol noch 7% Überlebende. Andererseits war die O_2 -Aufnahme bei 10^{-4} mol stark erhöht, bei 10^{-3} mol gehemmt. GILBY u. FEW (1957) fanden bei intakten Zellen von

Micrococcus lysodeicticus 99,9% ige Abtötung in 30 min bei 25°C durch $1,2 \cdot 10^{-3}$ mol Na-Dodecylsulfat (0,346 g/l) und $2,6 \cdot 10^{-3}$ mol Na-Dodecylsulfonat. DÖLL (1957) fand, daß Konzentrationen von 2,5 und 0,25 g/l handelsüblicher Reinigungsmittel die grampositiven Bakterien im physiologischen p_H -Bereich stärker als die gramnegativen hemmten. Diese werden dagegen erst im sauren Bereiche stärker sistiert. Diese anwendungstechnisch interessante Beobachtung gibt aber keinen Einblick in die Ursachen der größeren Resistenz, denn auch die gramnegativen Bakterien haben ja ihr Stoffwechsele optimum im physiologischen p_H -Bereich.

Wo oder in welchem definierten Konzentrationsbereich liegen die tatsächlichen Grenzen für die Sistierung der Atmung und der Abtötung und in welchem Maße stehen die Atmungshemmung und die Abtötung in direktem Zusammenhang?

Bei MINAMI (1956) waren in Versuchen mit Oleat Atmung und Methylenblau-Reduktion irreversibel verändert. In Suspensionen mit sistierter O_2 -Aufnahme fanden wir eine annähernd gleichlaufende Abnahme der wachstumsfähigen Zellen. Demnach müssen die vorher gezeigten Grenzkonzentrationen für die Sistierung der O_2 -Aufnahme auch als ungefähre baktericide Grenzen bei genügend langer Einwirkung gelten. Das läßt sich auch in

Suspensionstesten in Aq. dest. für einen annähernd übereinstimmenden WAS-Konzentrationsbereich bestätigen, wobei bei Vergleichsangaben die im Warburgapparat benutzte Temperatur von 38°C mit berücksichtigt werden muß.

Aber andererseits scheinen diese Grenzkonzentrationen in offenbarem Widerspruch zu stehen zu der Beobachtung, daß Bakterien oft in hochkonzentrierten Lösungen von WAS und nichtkonservierten Handelspräparaten mit bis über 25% WAS noch überleben können, und daß

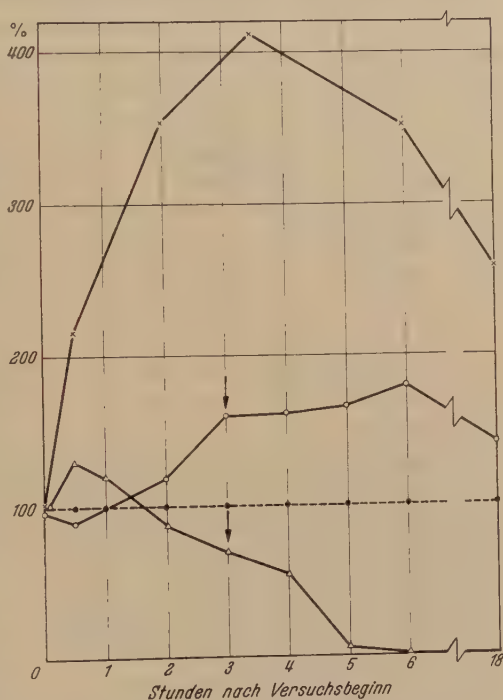


Abb. 5. O_2 -Aufnahme von *Mycobacterium phlei* G. in m/20 Phosphatpuffer. Ohne Zusatz = 100%. Mit je 0,01%: Glucose x—x, FAS o—o, ABS Δ—Δ. Meßzeit ↓ entsprechend Abb. 4. Darstellung: Q_{O_2} für je 30 min, 0—18 Std nach Versuchsbeginn in Prozent der Kontrolle ohne Zusatz

gramnegative Bakterien sich noch in mehrprozentigen Lösungen derartiger Präparate in anscheinend optimaler Weise vermehren (DAMM 1956). Darüber finden sich die widersprechendsten Angaben in der Literatur.

Eine Erklärung dafür kann man nun einmal aus unseren Beobachtungen ableiten, daß eine Begünstigung erfolgt, wenn gleichzeitig andere verfügbare Nährstoffe, wie assimilierbare *N*-Verbindungen und *C*-Quellen, z. B. Alkohol als Lösungsvermittler oder auch Anteile selbst als *C*-Quelle gut verwertbarer WAS vorliegen. Das paßt außerdem zu unserer Beobachtung, daß der Baustoffwechsel der gramnegativen Bakterien relativ am resistentesten ist.

Ein weiterer Gesichtspunkt verdient im Zusammenhang mit der Wirkungsweise der hohen WAS-Konzentrationen Beachtung: Bekanntlich verlieren anionische WAS-Moleküle von einer bestimmten „kritischen Konzentration“ c_k an die Eigenschaften von völlig dissoziierten Elektrolyten und bilden Micellen, wobei sich ihr chemisch-physikalisches Verhalten ändert. So beträgt c_k für das benutzte FAS-Präparat in Aq. dest. $8 \cdot 10^{-3}$ mol (2,32 g/l) und für ABS $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol (0,64 g/l). Weiter nimmt c_k in Gegenwart steigender anderer Elektrolytmengen laufend ab, wobei allein die Kationen wirksam sind [LANGE (1951)], während andererseits nach POWNEY u. ADDISON (1937) c_k von FAS durch den p_H -Wert im weiten Bereich von p_H 4,5—12 nicht beeinflußt wird. Dies ist eine äußerst wichtige Tatsache für Versuche mit WAS an lebenden Zellen und Enzymen. So verändert sich z. B. c_k im m/20 Phosphatpuffer unserer Versuche nach Messungen von LANGE gegenüber Aq. dest. bereits auf 0,29 g/l für FAS und 0,12 g/l für ABS.

Vergleicht man nun diese Werte für c_k mit den in unseren Atmungsversuchen ermittelten Grenzkonzentrationen für die Sistierung der O_2 -Aufnahme und die Abtötung, so wird ein enger Zusammenhang deutlich. Dazu paßt auch die Beobachtung von PRESTON (1948), daß im Bereiche der kritischen Konzentration sich auch die osmotischen Verhältnisse wesentlich verändern. Obwohl eine experimentelle Beweisführung dafür fehlt und auch methodisch sehr schwierig ist, daß z. B. der biologische bactericide Wirkungsbereich sich parallel zur Verschiebung von c_k verändert, so gibt doch bereits die Möglichkeit des Überlebens und Wachsens der gramnegativen Keime in hochkonzentrierten Präparaten Hinweise dafür, besonders auch, weil man diese Erscheinungen vor allem bei Komponenten-Präparaten mit Stickstoff (z. B. Harnstoff), Neutralsalzen und Lösungsmitteln u. a. findet, wodurch eine sehr wesentliche Veränderung der kritischen Konzentrationen eintreten muß. Auch die Angaben von ARMSTRONG (1957), daß die bisher beobachtete Diskrepanz der Angaben über die Na-Dodecylsulfat-Dosen, welche die aerobe CO_2 -Bildung der Hefe hemmen, ausschlaggebend durch die Konzentration der Na-, Li-,

Mg-, NH_4 -Ionen verursacht ist, bestätigen indirekt diese Beziehungen. Diese Zusammenhänge sind in komplexen Medien noch kaum untersucht worden, insbesondere auch nicht in bezug auf die biologischen Wirkungen. Hier sind beträchtliche methodische Schwierigkeiten zu überwinden.

Die Frage, ob der nahe Zusammenhang der biologischen Wirkungen mit dem Bereich der kritischen Konzentrationen allein durch die in diesem Bereiche maximale Elektrolytkonzentration bedingt ist, oder ob auch den Micellen in diesem Zusammenhang besondere biologische Wirkungen zukommen, läßt sich bisher nicht entscheiden. Eine gleichzeitige und unabhängige Bestimmung der nebeneinander als Elektrolyte oder Micellen vorliegenden WAS, zudem in komplexen Medien, ist experimentell nicht möglich. Man könnte nämlich auch fragen, ob eine steigende Micellen-Konzentration nicht eine biologische Wirkung der Elektrolyt-Moleküle antagonisieren kann. Viele Gesichtspunkte sprechen für die Elektrolyt-Wirkung als auslösende biologische Ursache, insbesondere die bekannte Bindung an Eiweiß. Darauf kommen wir unten noch zurück.

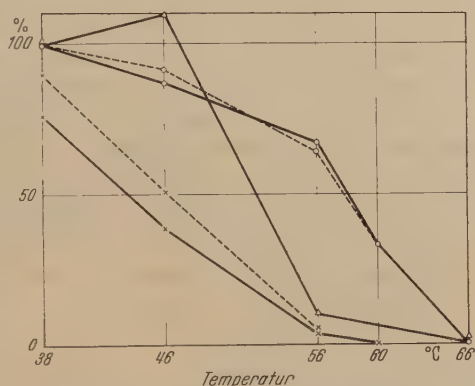


Abb. 6. *Myc. phlei* G. und B. Prozentuale O_2 -Aufnahme (Q_{O_2}) nach je 10 min Temperaturbehandlung in Aq. dest. ohne und mit ABS, bezogen auf 10 min Behandlung bei 38°C ohne ABS ($Q_{\text{O}_2}/38^\circ\text{C}/300\text{ min} = 100\%$). Anschließend manometrische Messung von Q_{O_2} im Warburg-Apparat in m/20 Phosphatpuffer pH 7,0. $\circ$ — $\circ$ Stamm G. ohne ABS, $\circ$ — $\circ$ Stamm B. ohne ABS, $\triangle$ — $\triangle$ Stamm G. ohne ABS, 20 min exponiert, $\times$ — $\times$ Stamm G. + 1:5000 ABS, $\times$ — $\times$ Stamm B. + 1:5000 ABS

III. Wirkung von WAS im Bereiche physiologischer Grenztemperaturen

Es konnte angenommen werden, daß gerade im Bereiche der physiologischen Grenztemperaturen die Grenzflächenwirkung dieser Substanzen sich besonders deutlich auf die Bakterienzellen auswirken müßte. Als Beispiel zahlreicher Versuchsanordnungen besprechen wir die Ergebnisse in Abb. 6 mit zwei *M. phlei*-Stämmen (G und B).

Wir exponierten dreifach gewaschene und im Kühlschrank vorbereitete, 5 Tage alte, auf DBA bei 37°C gewachsene *M. phlei* G- und B-Suspensionen in Wasser ohne oder mit 200 mg/l ABS je 10 min bei 38°, 46°, 56°, 60°, 66°C und haben sofort anschließend, nach entsprechender Verdünnung, damit keine Hemmung der O_2 -Aufnahme durch die im Ansatz befindliche WAS auftreten konnte, über je 300 min bei 38°C im Warburg die O_2 -Aufnahme gemessen.

Man ersieht aus der Abb. 6, daß bereits nach 10 min Temperaturbehandlung allein bei 56–60°C eine Depression der O_2 -Aufnahme eintritt

und nach 10 min bei 66° C die völlige Sistierung erfolgt. In vergleichbaren Suspensionstests stellten wir entsprechend in 10 min bei 66° C die Abtötung der eingepflichten Testkeime fest. Die Kurve ist natürlich sehr zeitabhängig, wie die beigegefügte Kurve für 20 min Temperaturbehandlung zeigt. Man muß also, um die Wirkung der beiden zusammenwirkenden Faktoren Temperatur und WAS differenzieren zu können, experimentell den richtigen Grenzbereich der Einzelwirkungen durch Versuche wählen. Der Versuch zeigt, daß bei gleichzeitiger Gegenwart von WAS in einer Konzentration, die an sich allein nur eine geringfügige Wirkung ergibt, eine ungewöhnlich größere Einwirkung bei erhöhter Temperatur erfolgt. Im Bereich der physiologischen Grenztemperaturen ist für beide Stämme durch WAS die baktericide Grenztemperatur ebenfalls nach unten verschoben. Auf diesen Erscheinungen beruht auch das Prinzip der Einweichwirkung und Thermo-Desinfektion tuberkulös infizierter Krankenhaus-Wäsche. Obwohl die WAS selbst keine Desinfektionsmittel sind, wird daraus verständlich, daß bei den üblichen Waschverfahren mit mehr oder weniger hoher Temperatureinwirkung in dem Zusammenwirken von Temperatur und WAS sich ein verbesserter und voll genügender Effekt einstellt.

IV. Die stammspezifischen Resistenzunterschiede zweier M. phlei-Stämme gegenüber WAS und die Frage eines möglichen Zusammenhanges mit der Katalaseaktivität

Wir zeigten vorher, daß die Resistenz des *M. phlei* G-Stammes ganz in der Größenordnung der grampositiven Bakterien (*St. aur.*) liegt. Weiter fanden wir aber noch beim Vergleich der zwei *M. phlei*-Teststämme, daß nicht zu übersehende, feinere stammspezifische Resistenzunterschiede vorhanden sind, die uns bei Dilutions- und Läppchentests darauf hinwiesen, daß auch bei der Austestung von chemisch-physikalischen Einwirkungen und von Desinfektionsmitteln die stammspezifischen Unterschiede berücksichtigt werden müssen. Das wird bisher erst wenig beobachtet, obwohl diese Tatsache z.B. für die Wertbestimmung von Antibiotica, Vitaminen u. a. ganz allgemein bekannt und selbstverständlich ist.

Die verschiedene WAS-Resistenz von *M. phlei* G und B ist aus dem Versuchsbeispiel in Tab. 1 ersichtlich.

Hier bot sich uns so die Möglichkeit, unabhängig von gattungsspezifischen Eigenschaften verschiedener Bakterien und von Unterschieden in bezug auf Kultur- und Nährbodenanforderungen, Temperatur usw. mögliche Zusammenhänge der WAS-Resistenz der Stämme mit ihrer verschiedenen Katalaseaktivität und anderen Eigenschaften aufzudecken.

Hier interessiert vor allem der in vielen Fällen beobachtete Zusammenhang hoher Katalaseaktivität der Zellen mit ihrer Resistenz gegen physikalische und chemische Noxen.

Höhere Resistenz gegenüber H_2O_2 , UV-Bestrahlung, 8-Oxychinolin und Actinophagen [PRÉVOT (1952), LÜCK (1953), vgl. auch ANDREJEW (1946) und UECKER (1955), MITTLER u. LAVERTY (1953), LATARJET (1952), BLINKS (1952), HUGHES u. HINSELWOOD (1955) u. SSOKOŁOWA (1956)].

Tabelle 1. Prozentuale Restatmung (Q_{O_2}) von *Mycobacterium phlei*, Stämme G und B nach 18 stündigem Aufenthalt in Wasser ohne oder mit WAS bei 20° C bezogen auf die jeweiligen Atmungsquotienten ($Q_{O_2}/300 \text{ min}/38^\circ \text{ C}$) ohne WAS-Zusatz.

Für Stamm G auch Vergleich von Zellen mit verschiedener Katalaseaktivität (Spalte 3 und 4)

Behandlung je 18 Std mit mg/l ABS	Stamm B von DBA $Q_{\text{Kat}} 253$ %	Stamm G von DBA $Q_{\text{Kat}} 1100$ %	Stamm G von 0,5% GBA $Q_{\text{Kat}} 2100\%$
ohne	100	100	100
100	98	87	91
250	100	55	49
500	86	33	35
1000	63	13	7

Zur Messung der Q_{O_2} wurden die ABS-behandelten Suspensionen mit Nährlösung so verdünnt, daß die Restkonzentrationen von ABS im Kontrollansatz die Messung nicht störten.

Bei den Mykobakterien besteht ein gleitender Übergang von der geringen Katalaseaktivität bei *M. tuberculosis* über die saprophytischen Mykobakterien zu anderen Bakterienarten. Auf die Beziehung zwischen der Isonicotinsäurehydrazid-(INH)-Empfindlichkeit und der Katalaseaktivität der Mykobakterien kann hier nur hingewiesen werden [vgl. UECKER (1955), BÖNICKE (1954), TIRUNARAYANAN (1956), LEMBKE (1953) u. a.].

Nach den bisher bekannten Zusammenhängen zwischen der Vitalität der Bakterien, ihrer Katalaseaktivität und der Resistenz gegenüber schädigenden Wirkungen schien es durchaus möglich, daß auch ein direkter Zusammenhang zwischen der verschiedenen WAS-Resistenz und der Höhe der Katalaseaktivität verschiedener Bakterien nachweisbar sein könnte und zugleich auch zu den vorher aufgezeigten differenzierten Wirkungen auf Bau- und Betriebsstoffwechsel, zumal LEMBKE u. MENNINGER (1952) gute Übereinstimmung zwischen der Katalaseaktivität und der Atmungsleistung bei *Myc. tb.* gefunden hatten, ebenso daß Seifen der Ölsäure und Elaidinsäure (2 mmol/l) die Katalase eines avirulenten *M. tb.*-Stammes hemmten und die Atmungshemmung eine Folge dieser Enzyminaktivierung sein sollte. Außerdem sind gerade bei den spezifisch WAS-resistenten gramnegativen Bakterien die bisher höchsten Katalaseaktivitäten gefunden worden. [Zusammenstellungen bei FUJITA u. KODAMA (1931) und UECKER (1955); z. B. $Q_{\text{Kat}} = 15000$ für *B. pyocyaneum* (*Ps. aeruginosa*).] Wir bestimmten u. a. für unsere unter den folgenden Namen geführten Teststämme: *B. pyocyaneum* = 5650, *Prot. vulg.* = 5200, *E. coli* = 780, *St. aur.* = 2800, *Streptococcus glycerinaceus* = 720, *Myc. (Nocardia) rubrum* = 3700, *Myc. (Nocardia) eos* = 2060, *Proact. (Nocardia) ruber* 12 = 1840, *Myc. lacticola* = 650.

Wir haben besonders die *M. phlei*-Stämme *G* und *B* in vielen Zusammenhängen zu ihrer Katalaseaktivität untersucht. Wir können hier nur in aller Kürze über diese ausgedehnten Versuche berichten.

In diesen Versuchen wurden immer gewaschene Zellen in ihren Eigenschaften und Reaktionen verglichen, weil nach unseren Erfahrungen bei direkt untersuchten Suspensionen und Zellen aus Nährlösung die Meßwerte oft in extremer Weise auseinandergehen.

Die Temperaturoptima und auch die Temperaturempfindlichkeit der beiden Stämme waren praktisch übereinstimmend, ebenso die O₂-Aufnahme bei Bau- und Betriebsstoffwechsel. Dagegen war die Ruheatmung bei Stamm *B* höher als bei Stamm *G*, bzw. ging bei Verarmung der Zellen an Reservestoffen langsamer zurück als bei *G*. Die Zellmassebildung des Stammes *B* auf DBA war in 5 Tagen größer als bei Stamm *G*. Stamm *G* hat eine stärkere rötlich-gelbe Farbstoffbildung. Der Gesamtlipidgehalt beider Stämme war im Rahmen der Bestimmungsfehler gleich und nach Waschen der Zellen mit WAS bei beiden Stämmen nicht meßbar verändert. Es war an die Möglichkeit einer unterschiedlichen Wirkung der WAS auf die Lipide der Cytoplasmamembran gedacht worden.

Die Katalaseaktivität (Q_{Kat}) der beiden Stämme unterscheidet sich in charakteristischer Weise. Bei 5 Tage alten, auf DBA bei 37° C gewachsenen und dreifach gewaschenen Zellen von Stamm *G* war Q_{Kat} im Mittel = 1200. Demgegenüber betrug Q_{Kat} im Mittel für Stamm *B* = 350. Auf DBA bei genau gleichen Kulturbedingungen blieb das Verhältnis stets gleich und auch verschiedenes Alter (2—29 Tage) hatte nur geringen Einfluß. Die Katalaseaktivität der Zellen von Stamm *B* war dann nie größer als 20—30% derjenigen von *G*. Auch beim Waschen der intakten Zellen ging in beiden Fällen nur ein kleiner, den Verhältnissen der beiden Stämme entsprechender Anteil Katalase in Lösung. Der Unterschied ließ sich demnach nicht mit einer größeren Löslichkeit der Katalase des Stammes *B* erklären.

Aus der Literatur ist auch bekannt, daß man die Katalaseaktivität der Zellen durch Kulturbedingungen (Belüftung u. a.) experimentell verändern kann. Interessant war nun, daß auf Glycerinbouillon-Agar (GBA) bei Stamm *G* Zellen mit wesentlich größerer bis verdoppelter Katalaseaktivität erhalten wurden. Aber bei Stamm *B* reagierte die Katalaseaktivität praktisch nicht auf Glycerin.

Stamm	Q_{Kat} auf Nährböden			
	DBA	0,5% GBA	1% GBA	3% GBA
<i>M. phlei G</i>	1100	2100	2070	1480
<i>M. phlei B</i>	253	284	226	200

Eine vergleichsweise Prüfung der Einwirkung von WAS auf derartige Suspensionen von Stamm *G* mit unterschiedlicher Katalaseaktivität ergab, daß die verschieden große Katalaseaktivität des gleichen Stammes

nicht in annähernd entsprechendem Maße die WAS-Resistenz der Zellen, gemessen an der Hemmung der O_2 -Aufnahme, verändert (Tab. 1, Spalte 3).

Trotz aller vorgenannten Versuche und Überlegungen konnten wir also nicht die Tatsache erklären, daß der Stamm *B* mit der geringeren Katalaseaktivität die größere Resistenz hat, ebenso ließ sich keine direkte Beziehung zwischen der Höhe der Katalaseaktivität und ihrer Abhängigkeit von anderen Faktoren aufzeigen.

Tabelle 2. Vergleich der prozentualen Abnahme der Atmungs- und Katalaseaktivität von Zellen von *Mycobacterium phlei* G und B nach 18stündigem Aufenthalt in wäßrigen ABS-Lösungen

Messungen nach dreimaligem Waschen der exponierten Suspensionen über Membranfiltern

Behandlung je 18 Std mit mg/l ABS	<i>Mycobacterium phlei</i> G			<i>Mycobacterium phlei</i> B		
	Q _{Kat}	Q _{Kat} in Prozent	Q _{O₂} in Prozent	Q _{Kat}	Q _{Kat} in Prozent	Q _{O₂}
ohne	1020	100	100	360	100	100
125	1010	99	79	360	100	84
1000	296	29	0	380	106	64
10000	316	31	0	319	88	0

Bei Versuchen über die Einwirkung der WAS auf die Katalaseaktivität selbst fanden wir weiter, daß die Hemmung der O_2 -Aufnahme der Hemmung der Katalaseaktivität bei den geprüften Stämmen nicht parallel läuft, sondern daß die Hemmung der O_2 -Aufnahme ganz offenbar primär erfolgt, und erst sekundär und nachwirkend die Katalaseaktivität verändert wird.

Ein Beispiel dafür gibt Tab. 2. Man sieht, daß in jedem Falle die prozentuale Hemmung der O_2 -Aufnahme größer ist als die Hemmung der Katalaseaktivität und bei völliger Sistierung der O_2 -Aufnahme ist noch eine beträchtliche Katalaseaktivität nachweisbar.

Zu ähnlichen Schlußfolgerungen kommen auch CHRISTOPHERSEN u. PRECHT (1952) bei Hefe über die Temperaturrestistenz der Katalase und Dehydrase, die sie wesentlich resistenter als die Vermehrungsfähigkeit fanden und die darum nicht für die Begrenzung der Lebensfähigkeit in Betracht kommen sollen. Ebenso wurde bei UV-Bestrahlung nach Verlust der Lebensfähigkeit noch Katalase gefunden, und IRO (1953) fand bei der Prüfung der Katalaseaktivität als Test für die Lebensfähigkeit von BCG-Vaccine, daß bei der Gefriertrocknung etwa 70% der Enzymaktivität aber nur 20% der Lebensfähigkeit erhalten blieben.

Sehr deutlich ist in Tab. 2 wieder die größere Resistenz von Stamm *B* als bei Stamm *G* sichtbar. Der Vergleich der Katalasequotienten in Tab. 2 zeigt, daß bei den mit sehr hohen WAS-Konzentrationen (1 und 10 g/l) behandelten Suspensionen der beiden Stämme dann die Katalase-Restaktivität beider Stämme überraschend auf etwa gleicher Höhe liegt, gegenüber dem viel größeren Anfangswert bei Stamm *G*.

Dies könnte auch zu der Frage führen, ob die hohe Gesamtkatalaseaktivität vom Stamm *G*, die sich zudem, wie wir vorher zeigten, auf GBA noch weiter erhöhen läßt, aus zwei verschieden labilen Katalasen zusammensetzt, ähnlich wie TER-KARAPETJAN (1955) für die nach Belüftung bei Hefen erhöhte Katalaseaktivität eine leichte Übergangsmöglichkeit von einer inaktiven in eine aktive Form annimmt.

Die 18stündige Behandlung der Suspensionen mit WAS erhöhte die Löslichkeit der Katalase aus den Zellen nicht. Die zellfreien Membranfiltrate der exponierten Suspensionen ergaben vergleichsweise je Milliliter nach Wasserbehandlung oder nach WAS-Behandlung bei Stamm *G* bei der H_2O_2 -Spaltung 60 bzw. 62 mm³ O_2 in 30 min und bei *B* 17 bzw. 17 mm³ O_2 .

V. Zur Frage des Wirkungsortes der anionischen WAS an der Bakterienzelle

Der Vergleich der prozentualen Restwerte für die O_2 -Aufnahme nach WAS-Behandlung in Tab. 1 und 2 zeigt außerdem, daß die Hemmung der O_2 -Aufnahme nicht durch Waschen reversibel ist.

MINAMI (1956) fand bei Versuchen mit Oleat eine irreversible Veränderung der Atmung und Methylenblaureduktion und schloß daraus auf eine Primärwirkung auf bestimmte Orte der Grenzfläche bzw. Zellstruktur. Das stimmt mit Versuchsergebnissen überein, die bei der Einwirkung von WAS auf Eiweiß gewonnen wurden [KUHN u. BIELIG (1940), NEURATH u. PUTNAM (1945) sowie KARUSCH (1952)] und mit den damit gewonnenen Vorstellungen, daß im Gegensatz zu den nichtionischen WAS, deren Wirkungen auf Eiweiß in erster Linie durch elektrostatische Kräfte bedingt sind, bei den anionischen WAS eine echte Bindung an den kationaktiven Gruppen des Protein-Moleküls erfolgt. Dabei sind wesentliche strukturelle Veränderungen wahrscheinlich, indem die Versuche der genannten Autoren darauf deuten, daß bei Bindung von großen Anionen an Albumin Streckung und Vergrößerung des Proteinmoleküls in Abhängigkeit von der Zahl der gebundenen Ionen eintritt. KENTEN (1958) fand, daß anionaktive WAS latente Phenoloxydase aktivieren kann und sieht als Ursache dafür ebenfalls ihre Bindungsfähigkeit an die kationaktiven Gruppen des Eiweißmoleküls. Auf Grund der pH-Spezifität dieser Erscheinung sollen dazu die Imidazolgruppen und die endständigen α -Aminogruppen in Betracht kommen oder die Keto-imido-Gruppen in Proteinen und Iminogruppen in Aminopolysacchariden und Lipiden.

Bei Versuchen über die Einwirkung von reinem Na-Dodecylsulfat auf Rinderserumalbumin [NEURATH u. PUTNAM (1945)] und insbesondere auch durch kalorimetrische Messungen der Reaktionswärmen [GODDARD u. PETHICA (1951)] wurde gefunden, daß maximal je Molekül Albumin 55 Moleküle Na-Dodecylsulfat gebunden wurden. Bei einem Molgewicht von ~ 70000 für Albumin und 15840 für WAS wäre das Gewichtsverhältnis 4,4 : 1 oder auf 100 Gewichtsteile Albumin 23,7 Teile WAS.

Interessant ist nun, daß man bei entsprechenden Überlegungen über unsere in Abb. 7 mitgeteilten Versuche mit *M. phlei G* über die Abhängigkeit der Hemmung der O_2 -Aufnahme von der Suspensionsdichte (TM in mg/ml) zu größenordnungsmäßig ähnlichen Verhältnissen kommt. Mit einer gewissen Berechtigung könnte man voraussetzen, daß die Hemmung

der O_2 -Aufnahme dann in direkter Beziehung zur Eiweiß-WAS-Bindung steht. Entnimmt man aus der Abb. 7, daß für unsere Meßzeit von 180 bis 240 min nach Zusatz der WAS bei einem TM/WAS-Verhältnis von 10,3:1 die O_2 -Aufnahme gerade nicht mehr gehemmt wird (100% Normalatmung) und bei einem Verhältnis von 3,86:1 die O_2 -Aufnahme gerade vollständig sistiert wird und setzt weiter den Eiweißgehalt der TM im Mittel mit etwa 50% ein [RIPPEL (1955)], so sind die entsprechenden Verhältnisse für je 100 Teile Zelleiweiß 19,4 Teile WAS als Grenze für die gerade die O_2 -Aufnahme nicht mehr beeinflussende WAS-Konzentration (und 51,8 Teile WAS als Grenzwert für die völlige Sistierung der Atmung) im Vergleich zu 23,7 Teile WAS, die an Rinderserumalbumin gebunden wurden. Aus dem experimentellen Vergleich dieser Beziehungen bei verschiedenen Bakterien und gleichzeitiger Berücksichtigung der verschiedenen Zusammensetzung der Zellen an Eiweiß und Lipoiden und ihrer damit wechselnden Bindungskräfte für WAS kann man weitere Aufschlüsse erwarten.

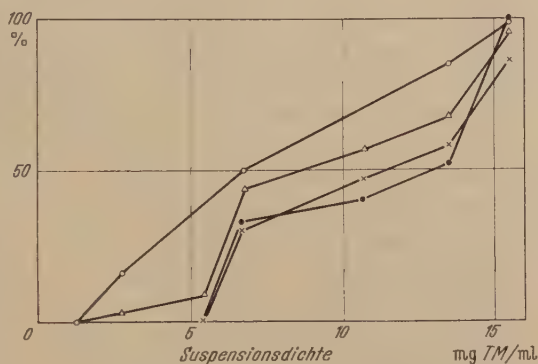


Abb. 7. *Mycobacterium phlei* G. Abhängigkeit der prozentualen Restatmung von der Suspensionsdichte in mg TM/ml nach Zusatz von 0,15% WAS. Restatmung bezogen auf 100% Normalatmung ohne WAS. Meßzeit: nach Zusatz.
 o—o—o 0—30 min, $\triangle$ — $\triangle$ — $\triangle$ 30—60 min,
 x—x—x 90—120 min, •—•—• 210—240 min

Zusammenfassung

Die bekannte Resistenzdifferenz von gramnegativen und grampositiven Bakterien gegenüber hohen Konzentrationen anionischer grenzflächenaktiver Substanzen (WAS) läßt sich durch die manometrisch gemessene prozentuale Hemmung der O_2 -Aufnahme exakt darstellen. Als Wirkungsmerkmal wird für die gramnegativen Bakterien eine prozentual größere Unempfindlichkeit des Bau- gegenüber dem Betriebsstoffwechsel erkannt, während es bei den grampositiven Bakterien gerade umgekehrt ist.

Die völlige Sistierung der O_2 -Aufnahme und die Abtötung erfolgen in reinwäßrigen WAS-Lösungen im Bereiche von 10^{-3} bis 10^{-2} . Zur Erklärung des Vorkommens von gramnegativen Bakterien in noch wesentlich höher konzentrierten WAS-Präparaten wird außer der bevorzugten Resistenz des Baustoffwechsels die Verschiebung der kritischen Konzentration (c_k) für die Micellbildung in komplexen Medien herangezogen und die biologische Bedeutung dieser Verschiebung diskutiert.

Das Zusammenwirken der beiden Faktoren WAS und physiologische Grenztemperatur in getrennt unterschwelliger Dosierung ergibt in der Kombination einen synergistischen Effekt. Der Grenzpunkt für die Sistierung der O₂-Aufnahme wird um etwa 10° C nach unten verschoben und die Abtötung wird beschleunigt.

Eine direkte Beziehung zwischen der verschiedenen WAS-Resistenz der Bakterien, insbesondere bei zwei ausführlich untersuchten *Myc. phlei*-Stämmen, und der Höhe ihrer Katalaseaktivität ließ sich nicht finden. Außerdem verläuft die Hemmung der O₂-Aufnahme und der Katalaseaktivität nicht parallel. Die O₂-Aufnahme wird primär und stärker gehemmt als die Katalaseaktivität und in Zellen mit völlig sistierter O₂-Aufnahme ist noch Katalase aktiv. Die Hemmung der O₂-Aufnahme durch hohe Konzentrationen WAS kann durch Waschen der Zellen nicht aufgehoben werden.

In Zusammenhang mit diesen Ergebnissen werden die Vorstellungen über die Wirkungsorte der anionischen grenzflächenaktiven Substanzen an der Bakterienzelle diskutiert und gezeigt, daß man durch Vergleich von Zellmasse/WAS-Verhältnissen für die Wirkungsgrenzen — völlige Sistierung der O₂-Aufnahme und völlige Enthemmung — ähnliche Größenordnungen erhält, wie sie für die Bindung im Modell Albumin/WAS bekannt sind.

Dem Leiter unseres Mikrobiologischen Laboratoriums, Herrn Dr. H. DAMM, möchte ich an dieser Stelle für sein freundliches Interesse an dieser Arbeit danken.

Literatur

- ANDREJEW, A.: Ann. Inst. Pasteur **72**, 833 (1946). — ARMSTRONG, W. H.: Nature (Lond.) **179**, 780 (1957).
 BLINKS, L. R.: J. Cell. Comp. Physiol. **39**, Suppl. 2, 11 (1952); ref. Angew. Chem. **65**, 221 (1953).
 BOLLE, A.: Pharm. Acta Helv. **32**, 1.—12. Januar 1957. Beilage zu: Schweiz. Apotheker-Ztg. — BÖNICKE, R.: Naturwissenschaften **41**, 430, 577 (1954).
 CHRISTOPHERSEN, J., u. H. PRECHT: Biol. Zbl. **71**, 585 (1952).
 DAMM, H.: Zbl. Bakt., II. Abt. **109**, 349 (1956). — DÖLL, W.: Brauwiss. **6**, 171 (1957).
 FUJITA, A., u. T. KODAMA: Biochem. Z. **232**, 20 (1931).
 GILBY, A. R., and A. V. FEW: Nature (Lond.), **179**, 422 (1957). — GODDARD, E. D., and B. A. PETHICA: J. chem. Soc. 1951/III. S. 2659.
 HUGHES, D. E. F., and S. C. HINSHELWOOD: J. chem. Soc. 1955/I. S. 347.
 ITO, K.: Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ., **5**, 1 (1953); zit. UECKER.
 KARUSCH, F.: J. physical. Chem., **56**, 70 (1952). — KATAGIRI, H., u. N. IKEMIYA: Symposia Enzyme Chem. (Tokyo) **12**, 5 (1957); ref. Chem. Zbl. 1957. 11332. — KETON, R. H.: Biochem. J., **68**, 244 (1958). — KUHN, R., u. H. J. BIELIG: Berichte Deutsche Chem. Ges. **73**, 1080 (1940).
 LANGE, H.: Kolloid Z. **121**, 66 (1951). — LATARJET, R., et L. R. CALDAS: C. R. Acad. Sci. (Paris) **235**, 1701 (1952). — LEMBKE, A., u. H. MENNINGER: Kieler Milchwiss. Forschber. **4**, 41 (1952). — LEMBKE, A., E. KRÜGER-THIEMER, R. B.

KUHN u. W. UECKER: Schweiz. Z. allg. Path. **16**, 222 (1953). — LÜCK, H.: *Experientia* (Basel) **9**, 340 (1953).

MINAMI, K.: *Nature* (Lond.) **178**, 743 (1956). — MITTLER, S., and J. A. LAVERTY: *Nature* (Lond.) **171**, 793 (1953).

NEURATH, H., and F. W. PUTNAM: *J. biol. Chem.*, **160**, 397 (1955).

POWNEY, J., and C. C. ADDISON: *Transact. Faraday Soc.* **33**, 243 (1937). — PRESTON J.: *Phys. Coll. Chem.* **52**, 85 (1948). — PRÉVOT, A. R., et H. THOUVENOT: *Ann. Inst. Pasteur* **88**, 443 (1952).

RIPPEL-BALDES, A.: *Grundriß der Mikrobiologie*, 3. Auflage. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955.

SSOKOLOWA, A. J., u. JA. I. RAUTERNSTEIN: *Mikrobiologie* (Russ.) **25**, 466 (1956); ref. *Chem. Zbl.* 1957, 7309.

TER-KARAPETJAN, M. A., A. M. ORGANDSHANJAN u. B. A. AKOPJAN: *Ber. Akad. Wiss. Armen. SSR.* **20**, 43 (1955); ref. *Chem. Zbl.* 1956, 3332. — TIRUNARAYANAN, M. O., u. W. A. VISCHER: *Naturwissenschaften* **43**, 474 (1956).

UECKER, W. *Zbl. Bakter, I. Abt. Orig.* **164**, 424 (1955).

WILLS, E. D.: *Biochem. J.* **60**, 529 (1955).

(Aus dem Institut für Gärungswissenschaft und Enzymchemie der Universität Köln)

Zur Kenntnis des Fettsäureabbaus durch Schimmelpilze

I. Mitteilung

Über die Methylketonbildung durch Schimmelpilze*

Von

W. FRANKE und W. HEINEN

Mit 3 Textabbildungen

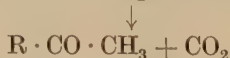
(Eingegangen am 16. April 1958)

Über den Fettsäureabbau durch Pilze, insbesondere seine enzymatische Seite, ist wenig bekannt. Der Nachweis einer Methylketonbildung aus Fettsäuren durch Schimmelpilze der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* war jedoch der erste und lange Zeit einzige Hinweis für das Vorkommen einer β -Oxydation in pflanzlichen Organismen (vgl. FRANKE u. FREHSE 1957).

STÄRKLE (1924) wies erstmalig nach, daß die in ranzigem Kokosfett aufgefundenen Methylketone (HALLER u. LASSIEUR 1910a, b) durch die Lebenstätigkeit von Schimmelpilzen aus gesättigten Fettsäuren mittlerer Kettenlänge entstehen. Im Anschluß an diese grundlegende Arbeit wurde in der Folgezeit der Abbau verschiedener Fette und definierter Fettsäuren durch Aspergillaceen ziemlich eingehend studiert (STOKOE 1928, COPPOCK, SUBRAMANIAM u. WALKER 1928, ACKLIN 1929, TÄUFEL, THALER u. LÖWENECK 1936).

Das Optimum der Methylketonbildung wurde meist für die Fettsäuren C_{10} bis C_{12} angegeben. Eine Methylketonbildung aus niederen Fettsäuren (C_4 , C_5) ist von einzelnen Untersuchern vermißt worden (STÄRKLE 1924, STOKOE 1928, ACKLIN 1929); doch zeigten spätere Untersuchungen (THALER u. GEIST 1939a, MUKHERJEE 1952a, b), daß die Methylketonbildung nicht nur vom verwendeten Pilzstamm, sondern auch von den Versuchsbedingungen (p_H , Reaktionszeit, Fehlen oder Vorhandensein von C-Quellen außer den Fettsäuren u. ä.) stark abhängig ist. Stets vermißt wurde Methylketonbildung bei den höheren Fettsäuren (Palmitin-, Stearin-, Ölsäure).

Der Chemismus der Methylketonbildung ist schon frühzeitig im Sinne einer abgewandelten β -Oxydation formuliert worden (z. B. von THALER u. GEIST 1939b):



ohne daß lange Zeit dafür Beweise vorlagen und ohne daß bis heute der enzymatische Nachweis dieser Reaktionsfolge erbracht wäre. Immerhin

* Herrn Prof. RIPPEL-BALDES in Verehrung zum 70. Geburtstag gewidmet.

erhielten THALER u. Mitarb. Methylketone mit *Pen. glaucum* auch aus α , β -ungesättigten Fettsäuren (THALER u. EISENLOHR 1941) und aus β -Oxyfettsäuren (THALER u. GEIST 1939b).

MUKHERJEE (1952a, b) hat den Abbau der Buttersäure teils durch wachsende Kulturen, teils durch Mycelsuspensionen von *Asp. niger* hinsichtlich der gebildeten Zwischen- und Endprodukte eingehend untersucht, kommt aber insofern zu keinen eindeutigen Ergebnissen, als er nach seinen Versuchen sowohl eine Dehydrierung der Buttersäure zu Crotonsäure als auch ihre direkte Oxydation zu β -Oxybuttersäure annehmen zu müssen glaubt.

In den bisher genannten Arbeiten waren als Methylketonbildner stets nur Aspergillaceen untersucht worden. Daß aber ein Fettsäureabbau bei Schimmelpilzen verbreiteter vorkommt, zeigen neuere Untersuchungen an *Neurospora crassa* (BEADLE 1945, LEIN u. LEIN 1950) und *Mucor mucedo* (STERN, ORDAL u. HALVORSON 1954), die sich in Nährlösungen mit höheren gesättigten und ungesättigten Fettsäuren als einziger C-Quelle zu entwickeln vermochten; auch für *Botrytis cinerea* (MÜLLER-STOLL 1951) und *Ophiostoma multiannulatum* (FRIES u. YUSEF 1955) wird Fettsäureverwertung — beträchtlich allerdings nur in Zucker- gegenwart — angegeben.

In der vorliegenden I. Mitteilung ist die Verbreitung der Methylketonbildung bei Schimmelpilzen auf breiterer Basis geprüft worden, wobei gesättigte Fettsäuren als einzige C-Quelle wachsender Kulturen dienten. Die Abhängigkeit der Methylketonbildung von verschiedenen Faktoren (Zeit, pH, C-Zahl der Fettsäure), die unter diesen Bedingungen nur bei *Pen. glaucum* (THALER u. GEIST 1939a) und *Asp. niger* (MUKHERJEE 1952a, b) zum Teil fragmentarisch untersucht worden war, wurde bei einer Auswahl verschiedener Pilze einer systematischen Untersuchung unterzogen. In einer nachfolgenden II. Mitteilung wird der Nachweis von Fettsäuredehydrasen in Schimmelpilzextrakten erbracht und ihr enzymchemischer Typus näher umrissen werden.

Methodik

1. Pilzmaterial und -züchtung

Zur Untersuchung kamen aus der Klasse der Ascomyceten außer Aspergillaceen (als „Standardorganismen“) Vertreter der Sordariaceen, aus der Klasse der Phycomyceten mehrere Gattungen der Mucoraceen und schließlich eine Reihe der zu den Fungi imperfecti zählenden Pilze. Eine Zusammenstellung aller 38 untersuchten Stämme findet sich in Tab. 1, S. 53. Die Pilze stammten mit wenigen Ausnahmen aus der Institutssammlung; ein *Aspergillus* wurde aus der Luft auf einer fettsäurehaltigen Nährlösung eingefangen, ein *Penicillium* aus Roquefort-Käse isoliert.

Die auf Würzeagar in Stammkultur gehaltenen Pilze wurden zu den Methylketon-Versuchen auf der von THALER u. GEIST (1939a) angegebenen Nährlösung folgender Zusammensetzung gezüchtet (Angaben in g/l): 5 Ammonsulfat, 5 prim. Kaliumphosphat, 1 Calciumnitrat (krist.), 1 Magnesiumsulfat (krist.), Spur Ferrichlorid, Spur Zinksulfat. Nach dem Sterilisieren wurden dieser Nährlösung die (mit NH_3) neutralisierten geradzahigen Fettsäuren (von C_4 bis C_{18}) in einer Menge von 3 g/l

zugesetzt. Die Züchtung erfolgte nach Beimpfung von 30 ml Nährlösung in 100 ml-Erlenmeyern mit Konidien bei 28° und — soweit nicht anders angegeben — bei pH 6,2—6,6. Zu den Versuchen mit ausgewählten Methylketonbildnern (Abb. 1—3) wurde aus „Vorkulturen“ auf einer Nährlösung mit Laurinsäure und Glucose (10 g/l) beimpft.

2. Präparate

Von den verwendeten Substraten stammten Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure von Heyl & Co., Capron-, Capryl- und Caprinsäure von Schuchardt. Die Testsubstanzen Aceton, Methylpropyl- und Methylisobutylketon kamen von Riedel-de Haën, Methylnonylketon von Heyl & Co.

3. Methylketonbestimmung

Die Bestimmung der in den Kulturlösungen gebildeten Methylketone geschah nach der gruppenspezifischen Salicylaldehyd-Reaktion (TÄUFEL u. THALER 1932a, b, TÄUFEL, THALER u. HOHNER 1937); bei der Kondensation der Methylketone mit Salicylaldehyd in Gegenwart starker Schwefelsäure entsteht eine Rotfärbung, die sich nach Herstellung einer homogenen Lösung durch Alkoholzusatz photometrieren läßt (Filter 530 $m\mu$ des Leitz-Photometers). Das Abdestillieren der Ketone aus den Kulturfiltraten erfolgte nach den Angaben von MUKHERJEE (1951). Von den 25 ml Destillat wurden jeweils 2 ml für die Farbreaktion verwendet.

Das Verfahren von TÄUFEL, THALER u. HOHNER (1937) wurde insofern etwas modifiziert, als das Reaktionsgemisch nicht 15 min in ein kochendes Wasserbad eingestellt, sondern rund 100 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen wurde; man vermeidet so eine im Leeransatz bisweilen auftretende intensive Gelbfärbung. Vorversuche hatten gezeigt, daß nach 100 min praktisch bei allen Methylketonen ein Grenzwert der Farbintensität erreicht war. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt aber mit steigendem Molekulargewicht des Methylketons stark zu; so waren nach 15 min langem Stehenlassen von Aceton erst 30, von Methylisobutylketon 50 und von Methylnonylketon rund 90% der maximalen Farbtiefe erreicht. Da die Mehrzahl der späteren Versuche an Laurinsäure (C_{12}) ausgeführt sind, wurde in diesem Falle zwecks Zeitersparnis schon nach 15 min die Extinktion gemessen und auf 100% umgerechnet.

Die Eichkurven für die Abhängigkeit des Extinktionsmoduls von der Methylketonmenge zeigten im Bereich zwischen 1 und 10 μ Mol sehr befriedigende Linearität (entsprechend z. B. 58—580 μ g Aceton und 170—1700 μ g Methylnonylketon); bei Mengen $< 0,5 \mu$ Mol wird das Verfahren wegen des relativ beträchtlichen Leerwertes ungenau. Die molaren Extinktionskoeffizienten variieren etwas mit dem Molekulargewicht der Methylketone; so erreichen diejenigen des Methylpropylketons und des Methylisobutylketons nur etwa 80% von demjenigen des Methylnonylketons. Aceton erreicht sogar nur etwa 50% von dem des letzteren: es ist wahrscheinlich, daß hier Verdampfungsverluste aus der sich durch den Schwefelsäurezusatz erhaltenden Reaktionsmischung eintreten; der Erscheinung wurde jedoch nicht weiter nachgegangen, da auch beim üblichen Verfahren die Reproduzierbarkeit der Extinktionswerte ausreichend war.

Da nur eine begrenzte Zahl von Test-Methylketonen aus dem Handel zur Verfügung stand, erfolgte die Auswertung der Fettsäurereihe (S. 56f.) in den Fällen, in denen das entsprechende Methylketon fehlte, nach der Eichkurve des in der C-Zahl jeweils am nächsten liegenden zugänglichen Methylketons; folgende Eichkurven wurden für die Säuren verschiedener C-Zahl verwendet: für C_4 Aceton, für C_6 Methylpropylketon, für C_8 und C_{10} Methylisobutylketon, für C_{12} und C_{14} Methylnonylketon.

Neben der Methode von TÄUFEL u. THALER wurde auch ein neueres, von BERRIDGE, ZIELINSKA u. BARRETT (1953) angegebenes Verfahren der Methylketonbestimmung geprüft, das statt konz. Schwefelsäure konz. Salzsäure verwendet. Wegen der rund 9 mal geringeren Farbintensität war die Methode für unsere Zwecke jedoch nicht ausreichend empfindlich.

Tabelle 1. *Bildung von Methylnonylketon (MNK)*
in laurinsäurehaltiger (0,3%) Nährlösung durch verschiedene Pilze
nach 4 tägiger Inkubation bei 28°

Samm- lungs- Nr.	Pilz	µg MNK	Samm- lungs- Nr.	Pilz	µg MNK
I. Phycomyceten					
506	<i>Rhizopus japonicus</i>	30	421	<i>Penicillium camemberti</i>	640
508	„ <i>nigricans</i>	210	410	„ <i>glaucum</i>	40
509	„ <i>nigricans</i>	120	414	„ <i>griseo-fulvum</i>	45
513	„ <i>tonkinensis</i>	620	451	<i>Acaulium albo-nigrescens</i>	0
515	„ <i>chinensis</i>	20	621	<i>Gliocladium</i> sp.	170
516	„ <i>oryzae</i>	320	462	<i>Neurospora crassa</i>	410
493	<i>Mucor plumbeus</i>	40	466	<i>Sordaria macrospora</i>	420
496	„ <i>hiemalis</i>	70			
521	<i>Absidia glauca</i>	0	III. Fungi imperfecti		
527	<i>Phycomyces blakesleeanae</i>	0	583	<i>Botrytis cinerea</i>	530
536	<i>Cunninghamella elegans</i>	20	588	<i>Oospora lactis</i>	0
			600	<i>Trichoderma koningi</i>	250
			602	<i>Dematium pullulans</i>	0
			612	<i>Cladosporium</i> sp.	370
311	<i>Aspergillus niger</i>	680	627	<i>Alternaria tenuis</i>	0
333	„ <i>oryzae</i>	300	633	„ <i>solani</i>	0
339	„ <i>fumigatus</i>	260	642	„ <i>gossypina</i>	30
343	„ <i>glaucus</i>	80	666	<i>Fusarium niveum</i>	70
352	„ <i>flavus</i>	40	670	„ <i>semitectum</i>	190
—	„ sp.	360	672	„ <i>sambucinum</i>	0
402	<i>Penicillium roqueforti</i>	30	674	„ <i>solani</i>	0
—	„ „	460			

V Versuchsergebnisse

1. Verbreitung des methylketonbildenden Fettsäureabbaus

Um einen Überblick zu gewinnen, wurde bei 38 verschiedenen Pilzen, die auf der früher angegebenen Nährlösung mit Laurinsäure als einziger C-Quelle gezüchtet wurden, nach 4 tägiger Inkubation bei 28° eine Methylketonbestimmung im Destillat der Kulturlösung durchgeführt. Ein sichtbares Mycelwachstum war nach dieser Zeit noch nicht eingetreten.

Man erkennt aus der Tab.1, in der nur Werte > 50 µg Methylketon als sicher positiv zu betrachten sind, daß keineswegs nur — wie bisher anzunehmen nahe lag — bei Aspergillaceen, sondern allgemeiner bei Ascomyceten, Phycomyceten und Fungi imperfecti Methylketonbildung aus Fettsäuren erfolgen kann, jedoch in sehr unterschiedlichem Maße und

nicht bei allen Arten der gleichen Gattung. Immerhin scheinen — auch nach dem beschränkten Material der Tab.1 — gewisse Gattungen (wie *Rhizopus*, *Aspergillus* und *Penicillium*) grundsätzlich mehr methylketonbildende Vertreter zu stellen als andere (z. B. *Alternaria* und *Fusarium*). Bemerkenswert ist auch bei den beiden Stämmen von *Pen. roqueforti* die viel größere Leistung der frischisolierten Kultur gegenüber dem alten Laboratoriumsstamm (402).

Was die quantitativen Verhältnisse der Methylketonbildung in bezug auf das eingesetzte Substrat anbetrifft, so ist zu berücksichtigen, daß sich die bestimmten Methylketonmengen auf $1/12,5$ des Gesamtansatzes beziehen. Sie würden daher $90/12,5 = 7,2$ mg Laurinsäure entsprechen. Bei Berücksichtigung des Molekulargewichtsverhältnisses Laurinsäure/Methylonylketon von $200/170$ würden auch im günstigsten Falle nur etwas über 10% der eingesetzten Laurinsäure als Methylketon erfaßt worden sein.

2. Zeitlicher Gang der Methylketonbildung

6 gute Methylketonbildner der Tab.1, nämlich *Rhiz. tonkinensis*, *Asp. niger*, *Pen. camemberti*, *Sord. macrospora*, *Neurosp. crassa* und *Botr. cinerea* wurden ausgewählt und in eine Reihe von jeweils zwei Parallelansätzen mit Laurat-Nährlösung von pH 6,2 eingepflegt. Am 3., 4., 5., 7., 10. und 14. Tage nach der Beimpfung wurden die in je einem Ansatz gebildeten Mengen an Methylonylketon bestimmt (Abb.1; bei *Rhiz. tonkinensis* und *Asp. niger* sind die Originalwerte, bei den übrigen Pilzen Mittelwerte aus den beiden Parallelansätzen wiedergegeben).

In jedem Falle ist ein Maximum der Methylketonbildung etwa am 7. Tage zu beobachten. Auftreten und Verschwinden des Methylketons geht dabei nicht gleichmäßig vor sich, jedoch ist der Verlauf auch nicht so ausgeprägt zickzackförmig, wie das bei den Untersuchungen von THALER u. GEIST (1939a) an *Pen. glaucum* oft der Fall gewesen war. In Übereinstimmung mit diesen Autoren steht wieder die Beobachtung, daß das Maximum der Methylketonbildung stets vor Erscheinen eines deutlich sichtbaren Mycels auftrat.

Da in der orientierenden Versuchsreihe der Tab.1 die Methylketonbildung am 4. Tage, also vor Erreichung des Maximums, bestimmt worden war, erschien es notwendig, die Methylketonbildung derjenigen Pilze, die am 4. Tage ein negatives oder unsicheres Ergebnis ($< 50 \mu\text{g}$ MNK) geliefert hatten, erneut zu prüfen. Tab.2 (S.56) enthält das Ergebnis der Versuchsreihe, in der bei einigen der Pilze die Methylketonmenge am 3., 4., 7. und 10. Tage, bei der Mehrzahl jedoch nur am 4. und 7. Tage bestimmt wurde.

Beim Vergleich von Tab.2 mit Tab.1 ist zu erkennen, daß sich bei den Phycomyceten und den Fungi imperfecti mit ganz wenigen Ausnahmen

(z. B. *Rhiz. chinensis*) nichts Wesentliches an den früheren Ergebnissen ändert, daß also die in Tab. 1 als negativ oder höchstens schwach positiv befundenen Pilze tatsächlich keine oder nur sehr schlechte Methylketonbildner sind. Etwas anders verhält es sich mit den *Aspergillaceen*: hier erreichen zum mindesten alle Penicillien recht gute Werte, reichliche Methylketonbildung tritt bei ihnen nur relativ langsamer ein.

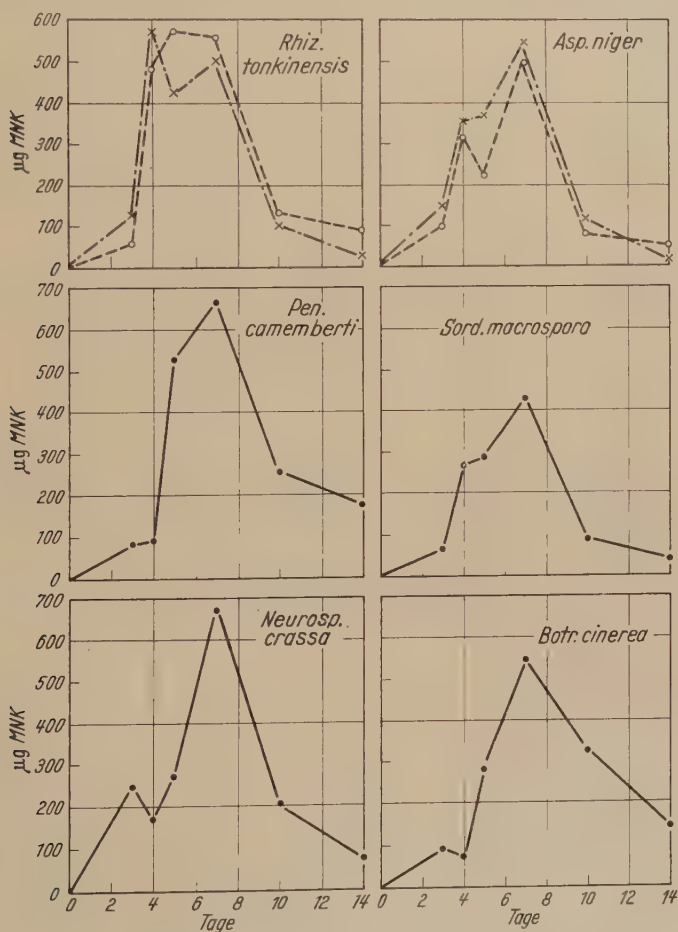


Abb. 1. Bildung von Methylnonylketon (MNK) aus Laurinsäure durch 6 verschiedene Pilze in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 28°

3. p_H -Einfluß

In den Untersuchungen von THALER u. Mitarb. war ein starker Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf die Methylketonbildung durch *Pen. glaucum* festgestellt worden (THALER u. GEIST 1939 a, b, THALER u.

Tabelle 2. Methylketonbildung (in μg) aus Laurinsäure durch die negativen oder unsicher positiven Organismen der Tab.1 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (in Tagen)

Pilz \ Tage	3	4	7	10	14
<i>Rhiz. japonicus</i>	10	35	60	70	30
„ <i>chinensis</i>	—	40	160	—	—
<i>Mucor plumbeus</i>	20	45	95	35	20
<i>Absidia glauca</i>	—	0	10	—	—
<i>Phyc. blakesleeana</i>	—	0	0	—	—
<i>Cunningh. elegans</i>	—	30	65	—	—
<i>Asp. flavus</i>	0	35	60	5	0
<i>Pen. roqueforti</i>	0	30	215	340	160
„ <i>glaucum</i>	—	55	370	—	—
„ <i>griseo-fulvum</i>	—	30	285	—	—
<i>Acaul. albo-nigrescens</i>	0	10	70	—	—
<i>Oospora lactis</i>	—	0	0	—	—
<i>Demat. pullulans</i>	—	0	40	—	—
<i>Altern. tenuis</i>	0	0	45	60	20
„ <i>solani</i>	10	60	60	—	—
„ <i>gossypina</i>	—	30	0	—	—
<i>Fusar. sambucinum</i>	—	0	0	—	—
„ <i>solani</i>	—	15	45	—	—

EISENLOHR 1941). Es wurden daher Versuche dieser Art mit 4 verschiedenen Pilzen (*Rhiz. tonkinensis*, *Pen. camemberti*, *Neurosp. crassa* und *Botr. cinerea*) angestellt. Die übliche laurinsäurehaltige Nährlösung wurde in Portionen auf resp. pH 3,0, 5,0, 6,0, 7,0 und 8,0 gebracht und nach Beimpfung am 3., 5., 7., 10. und 14. Tage die Menge des bei 28° gebildeten Methylketons bestimmt. In Abb.2 sind wieder Mittelwerte je zweier Parallelansätze angegeben.

Der Abbildung ist zu entnehmen, daß *Rhiz. tonkinensis* und *Neurosp. crassa* die bei weitem größten Methylketonmengen zwischen pH 5 und 6 bilden. Bei *Pen. camemberti* und *Botr. cinerea* erweitert sich der optimale Bereich auf pH 5—7.

Diese Ergebnisse stimmen mit den von THALER u. GEIST (1939a) bei *Pen. glaucum* an Laurinsäure erhaltenen nur teilweise überein; die Autoren stellten zwar oberhalb des Neutralpunktes (pH 7,5—8,5) eine nur schwache Methylketonbildung fest, fanden aber andererseits einen optimalen Bereich zwischen pH 3 und 5. Die Ursache der Diskrepanz bei im übrigen gleichen Versuchsbedingungen ist nicht ersichtlich.

4. Einfluß der Länge der Fettsäurekette

Zur Klärung dieser Frage, die von THALER u. Mitarb. sowie MUKHERJEE nicht systematisch bearbeitet worden war, wurden die zur pH -Reihe verwendeten Pilze in Nährlösungen von pH 6 geimpft, die die geradzahligen Fettsäuren (0,3%) von C_4 bis C_{16} (Butter-, Capron-, Capryl-, Caprin-, Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure) enthielten. Nach 2, 4, 7 und 10 Tagen

wurden wieder die gebildeten Methylketonmengen nach den früher (S.52) erwähnten Eichkurven ermittelt und diesmal in μMol ausgedrückt.

Abb. 3 (S.58) zeigt, daß bei allen vier untersuchten Pilzen das — schon nach 4 Tagen erreichte — Optimum der Methylketonbildung bei der Buttersäure liegt; ein zweites, erst nach 7 Tagen erreichtes Optimum liegt bei

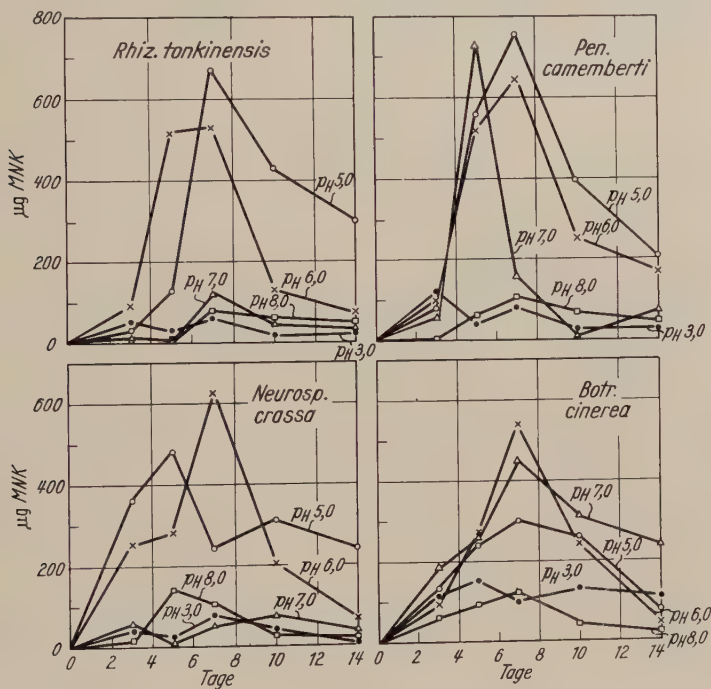


Abb. 2. Bildung von Methylnonylketon (MNK) aus Laurinsäure durch 4 verschiedene Pilze in Abhängigkeit vom pH der Nährlösung

der Laurinsäure (C_{12}), was bei *Rhizopus* und *Neurospora* deutlicher erkennbar ist als bei *Penicillium* und *Botrytis*. Auffallend ist der jähe Abfall der Methylketonbildung auf 0 beim Übergang von Myristinsäure auf Palmitinsäure; letztere wurde daher nicht in die Abbildung eingezeichnet. Daß dieser Abfall nicht durch ein Absinken der Dehydrase-Aktivität mit steigender C-Zahl bedingt ist, werden Befunde der II. Mitteilung dieser Reihe belegen.

Die rasche Erreichung maximaler Methylketonbildung bei den niederen Fettsäuren (C_4 und C_6) rührt wahrscheinlich daher, daß diese gut löslichen Substrate besonders leicht in die Zellen eindringen. Die Vermutung, daß die bei gleicher Gewichtskonzentration höhere molare Konzentration der niederen Fettsäuren (z. B. 0,034 m-Buttersäure gegen 0,015 m-Laurinsäure) bei deren starker Methylketonbildung

eine Rolle spiele, wird durch Befunde MUKHERJEEs (1952a) widerlegt, wonach die Acetonbildung aus Butyrat (bei pH 6,5) bei Konzentrationssteigerung von 0,01 auf 0,04 m nur um 5% zunimmt.

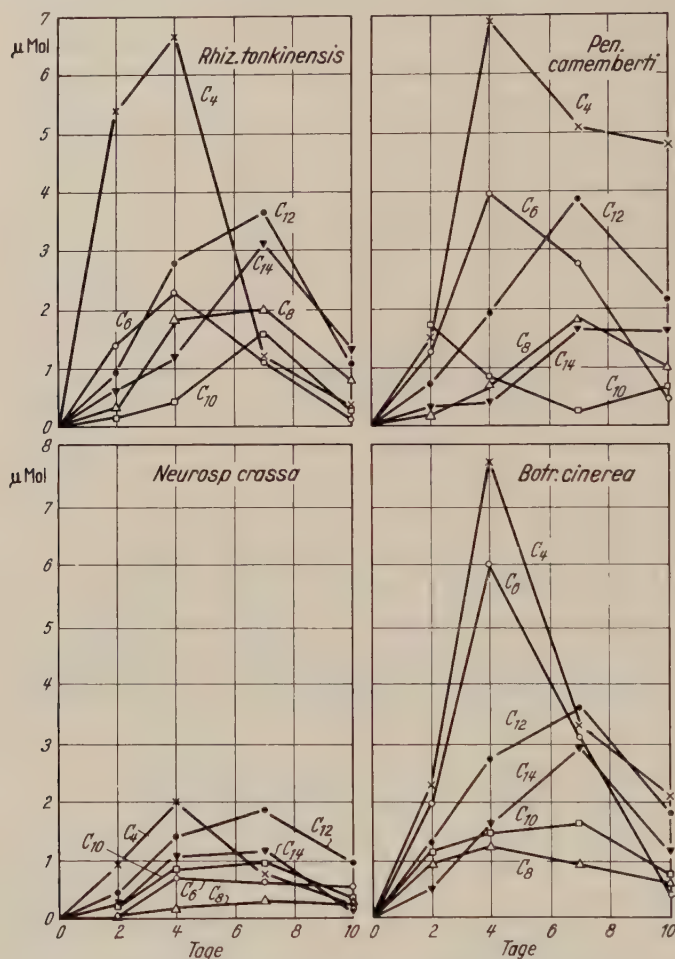


Abb. 3. Methylketonbildung durch 4 verschiedene Pilze in Abhängigkeit von der Kettenlänge der eingesetzten Fettsäure

Die kleinsten Methylketonmengen entstehen aus den mittleren Fettsäuren (C_8 , C_{10}), was vermutlich auf deren bekannte toxische Wirkung, die u. a. auch gegenüber Schimmelpilzen beobachtet wurde (WYSS, LUDWIG u. JOINER 1945, LEIN u. LEIN 1950, MÜLLER-STOLL 1951), zurückgeht.

Auffallend ist die geringe Aktivität des untersuchten *Neurospora*-stammes; die aus Laurinsäure gebildete Methylketonmenge (1,8 μMol =

306 μg) ist gegenüber den früheren Versuchen (Abb. 1 und 2) auf weniger als die Hälfte abgesunken. Da die Versuche mit den verschiedenen Fettsäuren einige Monate nach denen der Abschnitte 1—3 ausgeführt wurden, liegt offenbar eine — vielleicht durch die Vorzüchtung auf fettsäurehaltiger Nährlösung beschleunigte — „Degeneration“ vor. Ein solches Nachlassen in bestimmten physiologischen Leistungen tritt bei Laboratoriumstämmen aber oft auch ohne ersichtlichen Grund innerhalb kurzer Zeiträume ein (vgl. FRANKE u. TAHA 1952, FRANKE u. DE BOER 1958).

Zusammenfassung

1. Ein Fettsäureabbau zu Methylketonen, der bisher nur für Aspergillaceen bekannt war, wurde allgemeiner, jedoch nicht ubiquitär bei Phycomyceten, Ascomyceten und Fungi imperfecti verbreitet gefunden. Die aktivsten Methylketonbildner stellten die Gattungen *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Botrytis* und *Cladosporium*.

2. Das Maximum der Methylketonbildung aus Laurinsäure tritt nach 4—7 tägiger Inkubation bei 28° auf. Das pH -Optimum liegt im schwach sauren Gebiete (pH 5—7). Von den geradzahligen Fettsäuren liefert Buttersäure (C_4) am meisten und am raschesten Methylketon (Aceton), von den höheren Fettsäuren (langsamer) die Laurinsäure (C_{12}). Relativ schwach ist die Methylketonbildung bei den Säuren C_8 und C_{10} ; sie fehlt bei Säuren oberhalb C_{14} .

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe, dem Verband der Chemischen Industrie für Mittel zur Literaturbeschaffung.

Literatur

- ACKLIN, O.: Biochem. Z. **204**, 253 (1929). — BEADLE, G. W.: Physiol. Rev. **25**, 643 (1945). — BERRIDGE, N. J., M. ZIELINSKA u. J. BARRETT: J. Sci. Food. Agric. **4**, 472 (1953). — COPPOCK, P. D., V. SUBRAMANIAM u. T. K. WALKER: J. chem. Soc. (Lond). **1928**, 1422. — FRANKE, W., u. W. DE BOER: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., im Druck. — FRANKE, W., u. H. FREHSE: Handb. Pflanzenphysiol. **7**, 137. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1957. — FRANKE, W., u. E. M. TAHA: Chem. Ber. **85**, 913 (1952). — FRIES, N., u. H. M. YUSEF: Physiologia Plantarum **8**, 852 (1955). — HALLER, A., u. A. LASSIEUR: C. r. Acad. Sci. Paris **150**, 1013 (1910a); **151**, 697 (1910b). — LEIN, J., u. P. S. LEIN: J. Bact. **60**, 185 (1950). — MUKHERJEE, S.: Arch. Biochem. **33**, 364 (1951); **35**, 23 (1952a); **35**, 34 (1952b). — MÜLLER-STOLL, W. R.: Arch. Mikrobiol. **15**, 454 (1951). — STÄRKLE, M.: Biochem. Z. **151**, 371 (1924). — STERN, A. M., Z. J. ORDAL u. H. O. HALVORSON: J. Bact. **68**, 24 (1954). — STOKOE, W. N.: Biochem. J. **22**, 80 (1928). — TÄUFEL, K., u. H. THALER: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **212**, 256 (1932a). — Chem. Ztg. **56**, 265 (1932b). — TÄUFEL, K., H. THALER u. H. HOHNER: Z. Untersuch. Lebensmitt. **74**, 119 (1937). — TÄUFEL, K., H. THALER u. M. LÖWENECK: Fettchem. Umschau **43**, 1 (1936). — THALER, H., u. W. EISENLOHR: Biochem. Z. **308**, 88 (1941). — THALER, H., u. G. GEIST: Biochem. Z. **302**, 121 (1939a); **302**, 369 (1939b). — WYSS, O., B. J. LUDWIG u. R. R. JOINER: Arch. Biochem. **7**, 415 (1945).

(Aus dem Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Universität
Göttingen)

Über den Einfluß von Chinonoximbenzoylhydrazon auf das Wachstum von *Bacillus subtilis* *

Von

W. H. FUCHS und H. METZ

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Juli 1958)

Chinonoximbenzoylhydrazon ($\text{HON} = \text{C}_6\text{H}_4 = \text{N}-\text{NH}-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5$) (COBH) gehört zu einer Reihe von Verbindungen (PETERSEN u. Mitarb. 1955), die bei damit gebeizten Pflanzen einen guten Schutz gegen bodenbürtige Keimlingskrankheiten bewirken, welche durch sonst schwer bekämpfbare Pilzgruppen verursacht werden; dagegen erweisen sie sich in vitro gegenüber *Pythium* spp. und anderen Pilzen, die als Ursache dieser sogenannten Auflaufschäden in Frage kommen, nur als minimal fungitoxisch. Die Wirksamkeit dieser Verbindungen ist offenbar an die Gegenwart der Pflanze gebunden, in deren Hypokotyl die Beizwirkung persistent wird (FROHBERGER 1956). Dieses eigentümliche Verhalten veranlaßte uns, die Reaktionsweise von COBH und ähnlichen Stoffen unter verschiedenen Bedingungen im Plattentest gegen *Bac. subtilis* zu untersuchen. Anlaß zur Wahl dieses Verfahrens waren frühere, unveröffentlichte Versuche von METZ, in welchen sich der Plattentest mit Bakterien zu Untersuchungen über Wirkstoffe der Thiuram-Gruppe als brauchbar erwiesen hatte. Der übliche Plattentest wurde dabei so abgewandelt, daß die Testorganismen gleichzeitig dem Einfluß des Wirkstoffes und der Pflanzensubstanz ausgesetzt waren.

Methodik: 10 ml Fleischextrakt-Pepton-Agar [$\frac{1}{3}$ der üblichen Konzentration, nämlich 0,1% Fleischextrakt, 0,15% Pepton aus Casein (Merck), 2% Agar] wurden bei 50° C mit *Bacillus subtilis*¹ aus 48 Std alter Kultur in Fleischextrakt (0,3%)-Pepton(0,5%)-Lösung beimpft und in Petrischalen ($\varnothing$ 8 cm) ausgegossen, nach dem Erstarren sofort zum Test verwendet, bei 26° C bebrütet und nach 24 Std ausgewertet.

Soweit Pflanzensubstanz in die Versuche einbezogen wurde, wurde entweder frisches Blatt- oder Stengelmateriel im Mörser mit Quarzsand zu Brei zerrieben und im Lochtest verwendet oder ein wäßriger Extrakt aus getrockneten und pulverisierten Blättern und Stengeln dem Nährboden zugesetzt oder im Scheibchen- oder Lochtest geprüft.

¹ Vergleichende Prüfung von 22 verschiedenen Bakterienarten und -stämmen hatte ergeben, daß 11 Arten die hier beschriebene Reaktion zeigten, *Bac. subtilis* sich aber als besonders günstiger Testorganismus eignet.

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

Die Applikation der Wirkstoffe¹ erfolgte nach 3 verschiedenen Verfahren:

1. Durch Einbringen (oder -tropfen) der Lösung bzw. Suspension in ausgestanzte Löcher der Platte (Lochtest).

2. Durch Auflegen von Scheibchen ($\varnothing$ 5 mm) von Wirkstoffagar (Wirkstofflösung oder -Suspension, verfestigt mit 2% Agar) auf die Platten (Scheibchentest).

3. Durch Zusatz der entsprechenden Wirkstoffmengen bei der Zubereitung der Bakterienplatte (Wirkstoffplatten).

Das Wachstum von *Bac. subtilis* wird durch $5 \cdot 10^{-3}$ mol COBH und geringere Konzentration in keinem der 3 Testverfahren sichtbar beeinträchtigt. Werden aber z.B. Stengelquerschnitte von Erbse oder Tomate auf wirkstoffhaltige Platten aufgelegt, so entsteht um diese ein deutlicher Hemmhof. Gleiches ist der Fall, wenn im Loch- oder Scheibchentest fein zerriebenes Blatt- oder Stengelmateriale in Abständen von 2–10 mm vom Applikationsort des Mittels hinzugefügt werden. Abb. 1 zeigt deutlich, wie aus-

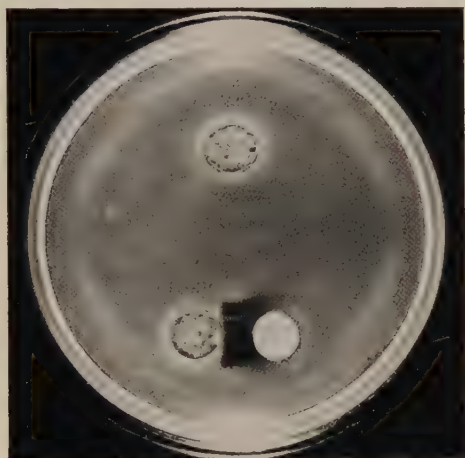


Abb. 1. Testplatte mit *Bac. subtilis* auf wirkstofffreiem Nährboden. Oben und unten links: Löcher mit Erbsenblattbrei; unten rechts: Loch mit 10^{-4} mol COBH

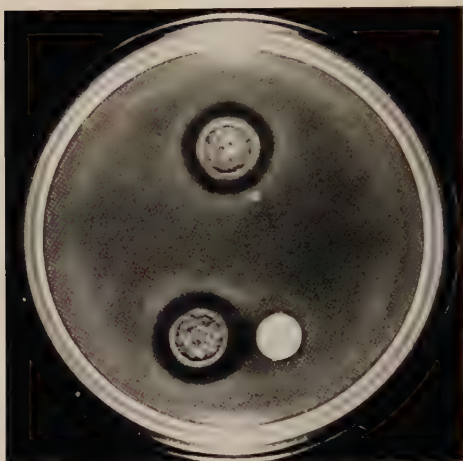
schließlich auf den Flächen, in welchen sich die Diffusionsfelder von Wirkstoff und Pflanzensubstanz überschneiden, das Bakterienwachstum unterbleibt. Der Umriß der meist verhältnismäßig scharf abgegrenzten „polarisierten“ Hemmhöfe weist auf die entscheidende Bedeutung der aus der Pflanzensubstanz herausdiffundierten Stoffe für die Aktivierung des Wirkstoffes hin. Auf Wirkstoffplatten entstehen naturgemäß konzentrische Hemmhöfe um die Pflanzensubstanz, umgekehrt werden um Wirkstoffscheibchen oder -Löcher Hemmzonen sichtbar, wenn dem Nährboden Pflanzenextrakt zugesetzt wird.

Unter den eingangs beschriebenen Bedingungen läßt sich dieser Effekt in allen 3 Testverfahren beliebig reproduzieren. Das gelingt auch, wenn

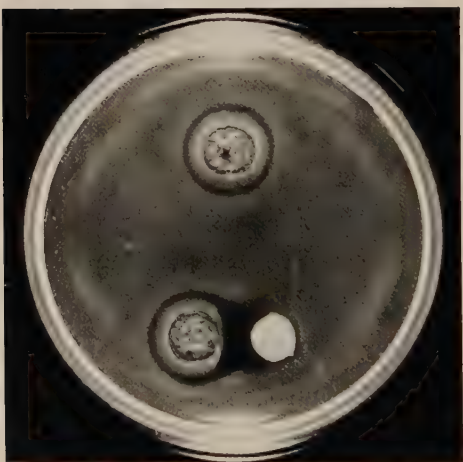
¹ COBH ist in Wasser sehr schlecht löslich, die angewandten Konzentrationen lagen meist oberhalb der Löslichkeitsgrenze; im Lochtest wurden also Suspensionen verwendet, während Wirkstoffagar durch ungelöstes COBH getrübt war. Obwohl so gesättigte Lösungen vorlagen, wurde die Wirksamkeit durch Erhöhung des nicht gelösten Anteils weiter verstärkt.

Agar durch Kieselgel ersetzt oder anstelle des Fleischextrakt-Pepton-Nährbodens ein synthetischer Nährboden (1% Glucose, 0,1% Kaliummonophosphat, 0,05% Magnesiumsulfat, 0,05% Natriumchlorid, 0,05%

Ammonnitrat, Spur Eisensulfat, pH etwa 7,0) verwendet wird. Der Durchmesser der Hemmhöfe hängt jedoch (abgesehen von der Konzentration, der Löslichkeit und Diffusionsfähigkeit verschiedener geprüfter Wirkstoffe) vor allem von der Konzentration der Nährstoffe in den Testplatten ab. So ist der Hemmhof auf dem üblichen Fleischextrakt (0,3%)-Pepton (0,5%)-Agar geringer, als auf dem empfohlenen Substrat.



a



b

Abb. 2. Wirkstofftestplatte mit *Bac. subtilis*. a oberes Bild: $5 \cdot 10^{-5}$ mol COBH in der Platte. b unteres Bild: 10^{-5} mol COBH in der Platte. In beiden Bildern oben und links unten Erbsenstengelbrei, unten rechts $5 \cdot 10^{-3}$ mol COBH. Die bei geringer COBH-Konzentration um den Brei gebildete Wachstumszone wird durch zusätzliche COBH-Gabe ausgelöscht

Die Abhängigkeit der Hemmung von dem Verhältnis zwischen Nährstoffmenge und Wirkstoffkonzentration wird bei der Prüfung von Konzentrationsreihen besonders deutlich. Bei der Prüfung von 10^{-5} mol COBH nach Verfahren 3 treten im Diffusionsfeld der Pflanzensubstanz (Abb. 2a) ringförmige Hemmzonen auf, die eine Zone geförderten Wachstums umschließen. Neben den Stoffen, die den Wirkstoff aktivieren, treten naturgemäß Bakteriennährstoffe in das Diffusionsfeld aus und begünstigen vor allem in seinem inneren Teil das Bakterienwachstum. Dieser Einfluß überwiegt dort die

Hemmung durch das aktivierte COBH, die erst in dem äußeren, nicht mit zusätzlichem Nährstoff versorgten Teil des Diffusionsfeldes in

typischer Weise in Erscheinung tritt. Der äußere Durchmesser des Hemmrings von etwa 5 mm (gemessen vom Außenrand des mit Pflanzensubstanz beschickten Loches) entspricht dem eines Hemmhofes, der unter gleichen Bedingungen auf Platten entsteht, die mit $5 \cdot 10^{-5}$ mol COBH beschickt wurden, und der offensichtlich der maximalen Ausbreitungsfähigkeit der aktivierenden Pflanzensubstanz entspricht. Der bei 10^{-5} mol COBH noch deutlich sichtbare Hemmring kann dadurch in einen Hemmhof umgewandelt werden, daß im Abstand von etwa 8 mm von dem mit Pflanzensubstanz beschickten Loch ein Wirkstoffscheibchen ($5 \cdot 10^{-3}$ mol COBH) zusätzlich aufgesetzt wird (Abb. 2 b). Aus diesen Befunden läßt sich auch die Erfassungsgrenze bei der hier beschriebenen Versuchsanordnung festlegen. Eindeutige Hemmhöfe werden bis zu $5 \cdot 10^{-5}$ mol COBH erhalten. Hemmringe, die durch zusätzliche Wirkstoffgabe über Scheibchen zu Höfen entwickelt werden können, entstehen noch bei 10^{-5} mol (gleich $2,4 \cdot 10^{-4}$).

Eingehendere Untersuchungen über den Mechanismus, der dem geschilderten Zusammenwirken von Pflanzenstoffen mit COBH zugrundeliegt, waren uns bisher nicht möglich. Aus einigen Testversuchen ergibt sich folgendes:

1. Obgleich bei der Prüfung verschiedener dem COBH strukturell nahestehender Körper sich zeigte, daß Wirkstoffe von höherer Wasserlöslichkeit in unterschiedlichem Ausmaß auch ohne Zusatz von Pflanzensubstanz das Bakterienwachstum hemmen können, ergab sich kein Anhaltspunkt dafür, daß die Aktivierung von COBH im Diffusionsfeld der Pflanzensubstanz auf eine Lösungsvermittlung zurückzuführen ist; denn aktivierende Pflanzensubstanz verstärkt unabhängig vom Ausmaß der Eigenwirkung auch den Effekt besser wasserlöslicher Wirkstoffe. Die Hemmwirkung tritt deutlich auch in solchen Konzentrationen von COBH in Erscheinung, bei denen dieser Stoff vollständig gelöst ist, und läßt sich durch den Zusatz von Dimethylformamid als Lösungsvermittler zum Nährboden (das in den erforderlichen Konzentrationen von *Bac. subtilis* vertragen wird) praktisch nicht verändern.

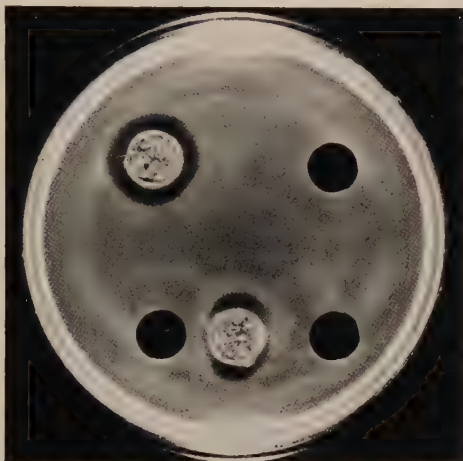


Abb. 3. Wirkstoff ($5 \cdot 10^{-5}$ mol COBH)-Testplatte mit *Bac. subtilis* mit Ascorbinsäurezusatz. Oben links und unten Mitte: Erbsenstengelbrei. Oben rechts und unten links u. rechts: 0,1% Ascorbinsäure. Die COBH-Hemmung wird durch Ascorbinsäure kompensiert

2. Auf Grund der Molekülstruktur von COBH liegt es nahe, die Aktivierung auf reduktive Veränderungen zurückzuführen (PETERSEN 1955). Die möglicherweise abspaltbare Benzoessäure erweist sich in äquivalenter Menge als inaktiv. COBH-Verwandte mit anderen Acylresten verhielten sich dem COBH ähnlich. Um den Einfluß oxydierender und reduzierender

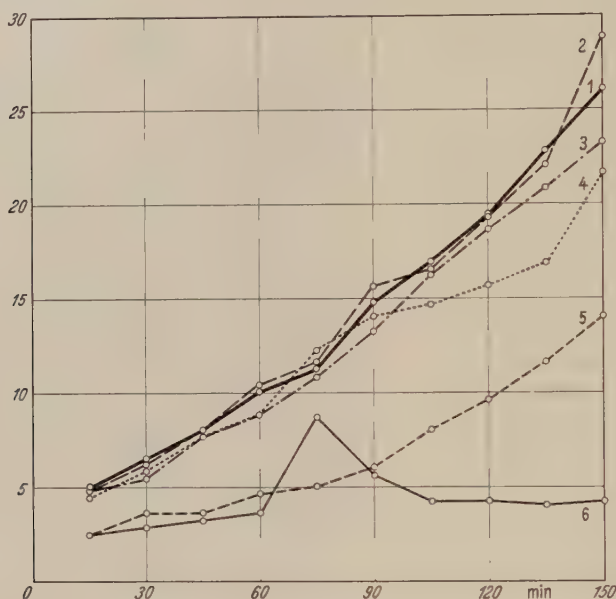


Abb. 4. Der Einfluß des Zusatzes von „Pflanzenextrakt“ auf die O_2 -Aufnahme von *Bac. subtilis* in wirkstoffhaltigen Kulturen (16 Std alte Kultur; „Pflanzenextrakt“ neutralisiert; Zugabe 60 min nach Versuchsbeginn)

	Hauptgefäß	Seitenarm
Kurve 1	Wasser	Wasser
Kurve 2	Wasser	Extrakt
Kurve 3	10^{-4} mol COBH	Wasser
Kurve 4	10^{-4} mol COBH	Extrakt
Kurve 5	$5 \cdot 10^{-4}$ mol COBH	Wasser
Kurve 6	$5 \cdot 10^{-4}$ mol COBH	Extrakt

Substanzen abzutasten, wurden im Mehrlochtest auf Wirkstoffplatten in verschiedenen Abständen von der Pflanzensubstanz entsprechende Stoffe zugefügt. Wider Erwarten unterblieb in Gegenwart reduzierender Substanzen (z. B. 0,1% Ascorbinsäure, Abb. 3, S. 63) die Ausbildung des Hemmhofes. Dieser wurde dagegen vergrößert und verstärkt, wenn Oxydationsmittel geboten wurden, z. B. eine Aufschwemmung von 0,1—1% MnO_2 . Allerdings sei vorerst offengelassen, ob in diesen Testen der Wirkstoff oder die aktivierende Pflanzensubstanz verändert wurde.

3. Zur näheren Kennzeichnung der eigentümlichen Wechselwirkung von Pflanze und Wirkstoff wurde der Gaswechsel von *Bac. subtilis* unter dem Einfluß verschiedener Zusätze nach der Warburgtechnik untersucht.

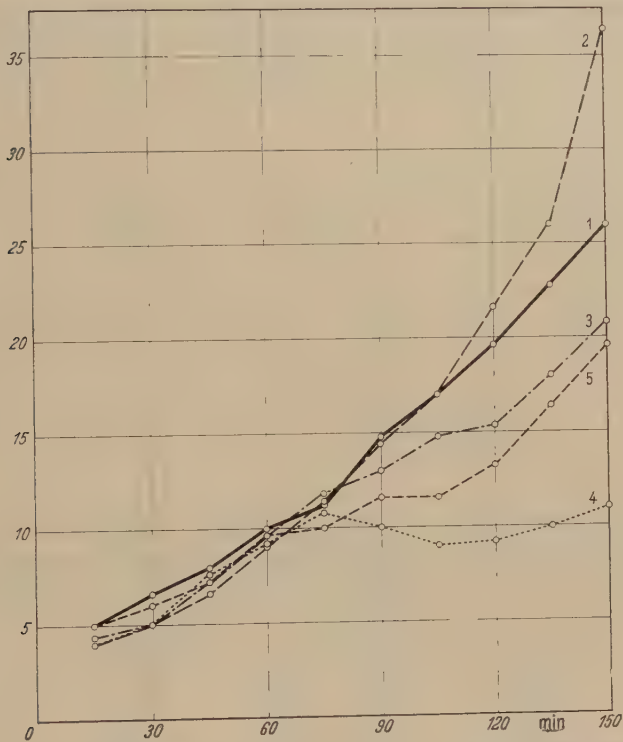


Abb. 5. Der Einfluß eines COBH-Zusatzes auf die O₂-Aufnahme von *Bac. subtilis* in „pflanzenextrakt“-haltiger Lösung (Versuchsbedingungen wie in Abb. 4; Konzentration auf Endvolumen berechnet)

	Hauptgefäß	Seitenarm
Kurve 1	Wasser	Wasser
Kurve 2	Extrakt	Wasser
Kurve 3	Extrakt	5 · 10 ⁻⁴ mol COBH
Kurve 4	Extrakt (verd. 1:3)	5 · 10 ⁻⁴ mol COBH
Kurve 5	Wasser	5 · 10 ⁻⁴ mol COBH

Methodik: *Bac. subtilis* wurde 16 Std bei 26° C in der üblichen Fleischextrakt-Pepton-Nährlösung vorkultiviert, die Kultur mit der dreifachen Menge frischer Nährlösung verdünnt und je 2,7 ml in ein 15 ml Reaktionsgefäß gefüllt. Nach ein-stündigem Wachsen bei 26° C wurden aus dem Seitenansatz 0,3 ml Wirkstoff-suspension oder Pflanzenextrakt hinzugefügt. Die Sauerstoffaufnahme wurde bis zu 150 min nach dem Ansatz bei 26° C gemessen.

In diesen Untersuchungen zeigten sich ähnliche Tendenzen wie im Plattentest; bei Zusatz einer entsprechenden Konzentration des Pflanzenextrakts (vgl. Abb. 4, S. 64) wurde nach kurzem Anstieg die O_2 -Aufnahme einer Kultur, die $5 \cdot 10^{-4}$ mol COBH enthielt, gegenüber einer wirkstofffreien Kultur deutlich reduziert. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 10^{-4} mol war dieser Effekt noch schwach erkennbar. Einkippen von COBH in eine wirkstofffreie Kultur (vgl. Abb. 5) vermindert auch in Abwesenheit

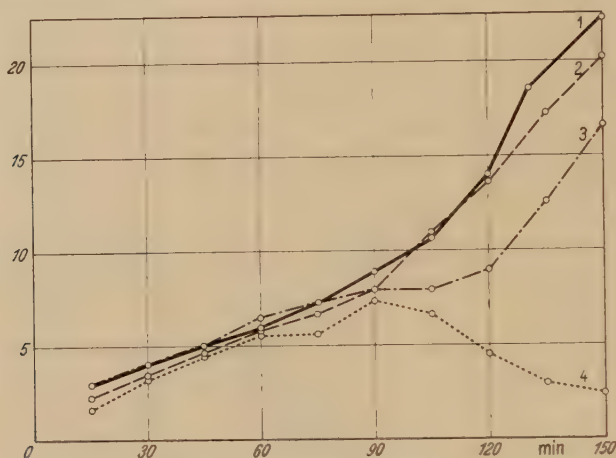


Abb. 6. Wirkung von Zusätzen von „Pflanzenextrakt“, $KMnO_4$ (12 ppm) und COBH ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) auf die O_2 -Aufnahme von *Bac. subtilis* (18 Std alte Kultur; Konzentrationen bezogen auf Endvolumen)

	Hauptgefäß	Seitenarm
Kurve 1	Extrakt + Wasser	Wasser
Kurve 2	Extrakt + $KMnO_4$	Wasser
Kurve 3	Extrakt + Wasser	COBH
Kurve 4	Extrakt + $KMnO_4$	COBH

von Pflanzenextrakt die O_2 -Aufnahme. In Gegenwart geringer Extraktmengen ist diese Wirkung aber wesentlich verstärkt. Erhöht man die Extraktmenge auf das 3fache, so überwiegt im Vergleich zu dem Verhältnis extraktfreier Kulturen der fördernde Nährstoffeffekt des Extrakts bereits die Hemmung. Letzteres zeigt wiederum deutlich das Wechselspiel zwischen Nährstoffen und Aktivierungsstoff, welche in der Gaswechseluntersuchung nicht wie im Plattentest durch Diffusion in ihrer Wirkung getrennt werden können. Es würde hier zu weit führen, die sich hieraus wie aus unvermeidlichen Unterschieden in der Vorkultur und im physiologischen Zustand der Testbakterien sich ergebenden Schwierigkeiten für Gaswechseluntersuchungen näher zu erörtern. Es sei lediglich in Abb. 6 gezeigt¹, daß auch die verstärkende Wirkung von Oxydations-

¹ Herrn TEUTEBERG danken wir für die Durchführung dieses Versuches.

mitteln (hier $12 \times 10^{-4} \text{ ‰ KMnO}_4$) in Gegenwart von Pflanzenextrakt die COBH-Wirkung stärker zum Ausdruck bringt.

Die beschriebenen Versuche geben zwar einige Hinweise auf Deutungsmöglichkeiten für die Wege der Beizwirkung durch COBH, lassen aber natürlich keine endgültigen Schlüsse auf das Zusammenspiel von Wirkstoff, lebender Pflanze und abzuwehrenden Parasiten zu. Immerhin mag erwähnt sein, daß mit etwas abgeänderter Methodik die hier am Verhalten von *Bac. subtilis* geschilderten Ergebnisse auch mit *Pythium* spp. erhalten werden können. Eine eingehendere Diskussion muß an anderer Stelle erfolgen.

Für ähnliche Untersuchungen über die Wirkung natürlicher und synthetischer bakteriostatischer und fungistatischer Stoffe scheint uns aber der Befund nicht unwesentlich zu sein, daß das Ausmaß der insbesondere durch Plattenteste verschiedener Art feststellbaren Hemmungen nicht nur vom Verhältnis der Konzentration von Wirkstoff und Nährsubstrat, sondern auch vom Vorhandensein und der Konzentration weiterer, oft für sich allein unwirksamer Stoffe abhängt.

Den Bayerwerken danken wir verbindlichst für Unterstützung unserer Untersuchungen.

Literatur

FROHBERGER, P. E.: Untersuchungen über die Wirkung von Chinonoximbenzoylhydrazon gegen Keimlingskrankheiten verschiedener Kulturpflanzen. *Phytopath. Z.* **27**, 427—455 (1956). — PETERSEN, S., W. GAUSS u. E. URSCHAT: Synthese einfacher Chinonderivate mit fungiziden, bakteriostatischen oder cytostatischen Eigenschaften. *Angew. Chem.* **67**, 217—231 (1955).

(Aus dem Hygiene-Institut der Universität Bonn)

Zur Organisation des Zellkerns von *Bacillus megaterium**

Von

P. GIESBRECHT und G. PIEKARSKI

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Juni 1958)

Cytologische Untersuchungen an Bakterien hatten ergeben, daß die Desoxyribonucleinsäure (DNS) in morphologisch definierten Körpern vorliegt, die sich gesetzmäßig teilen und die gleiche Kontinuität besitzen, wie sie den Zellkernen höher organisierter Zellen zukommt.

Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Feinstruktur der sogenannten Nucleoide erbrachten wegen des begrenzten Auflösungsvermögens der optischen Systeme keine allgemein anerkannten Ergebnisse (vgl. DE LAMATER 1956, ROBINOW 1956a), so daß die Frage unentschieden bleiben mußte, ob diese Strukturen einen Zellkern (DE LAMATER, vgl. 1954a, 1956, KNAYSI, vgl. 1954, 1955, 1956), ein Nucleoid (PIEKARSKI 1937, BISSET 1957), ein funktionelles Kernäquivalent (PIEKARSKI 1950), ein Chromosom (ROBINOW 1944) bzw. ein Chromosomenpaar (GUHA et al. 1954, BISSET, vgl. 1955) oder gar ein Gen (PELS-LEUSDEN und FREYMARK 1956) repräsentieren. ROBINOW (1956) schlug daher vor, den schon vielfach benutzten indifferenten Begriff Chromatinkörper („chromatin-bodies“) wieder aufzugreifen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Feinbau der DNS-haltigen Strukturen der Bakterien mit Hilfe der Dünnschnitt-Methode — seit den ersten Untersuchungen von BAKER u. PEASE (1949) liegen fast 50 einschlägige Publikationen vor — führten bisher nicht zu einheitlichen Ergebnissen. PIEKARSKI u. GIESBRECHT (1956) waren jedoch zu der Auffassung gekommen, daß die in den sog. Kernvacuolen von *Bac. megaterium* nachgewiesenen fädigen Strukturen die elektronenmikroskopischen Äquivalentbilder der chromosomalen Strukturen der Bakterienkerne darstellen, die in einer Kerngrundsubstanz liegen und dadurch vom Cytoplasma deutlich abgegrenzt werden.

Diese Auffassung blieb nicht ohne Widerspruch (ROBINOW 1956b, PREUSSER, SCHLOTE u. RIPPEN-BALDES 1957). Es zeigte sich auch, daß schon in Abhängigkeit von der Präparationsmethode unterschiedliche Ergebnisse auftreten können. Daher erschien es uns von größter Bedeutung, den Zellkern einer höher organisierten Zelle als Vergleichsobjekt heranzuziehen. Wir wählten dafür den Chromosomenkern des Dinoflagellaten *Amphidinium elegans*, da dieser offenbar eine typische Interphase nicht ausbildet (GRELL 1956), und die Chromosomen auch in unfixierten Zellen stets deutlich erkennbar bleiben (Abb. 1). Damit hatten wir den für diese

* Herrn Professor Dr. A. RIPPEN zum 70. Geburtstag.

Fragestellung außerordentlich günstigen Sonderfall eines Zellkerns vor uns, der gleichzeitig ein ideales „Chromosomen-Modell“ darstellt; denn hier lassen die Chromosomen als solche im Vergleich zu den Chromosomen höher organisierter Zellen nur einen relativ geringen Formwechsel erkennen, wobei wohl vor allem die völlige Entspiralisierung der Chromosomen ausbleibt. Dadurch wurde die Untersuchung an unserem Vergleichsobjekt gleichsam auf Chromosomen beschränkt, die quasi permanent im „Mitose-Zustand“ verharren, so daß damit die Möglichkeit gegeben war, durch die Präparation hervorgerufene Veränderungen weitgehend als solche zu erkennen und diese von den wechselnden Kernzuständen zu differenzieren.

Zwischen unserem Bakterienmodell *Bac. megaterium* und dem Dinoflagellaten-Kern schien uns auch insofern eine Parallele zu bestehen, als sich die Feulgen-positiven Strukturen der Bakterien — zumindest in der logarithmischen Wachstumsphase — wahrscheinlich niemals in einer eigentlichen Ruhephase be-

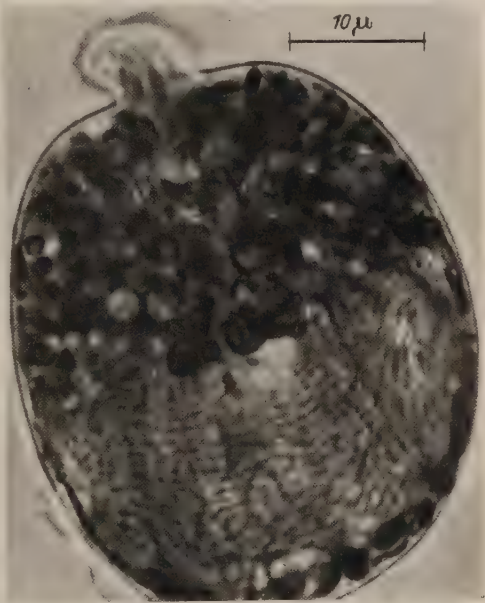


Abb. 1. *Amphidinium elegans*. LM

finden. Schon in den ersten orientierenden Schnitten durch die Chromosomen des Dinoflagellaten ließen sich z.B. verschiedene Erscheinungsformen fädiger Strukturen darstellen, die mit denen der Bakterien morphologisch durchaus vergleichbar erscheinen (vgl. GIESBRECHT 1957). In Fortführung dieser Arbeiten wurde versucht, die Natur der chromosomalen Strukturen genauer zu analysieren; über einen Teil dieser Untersuchungen wurde bereits von GIESBRECHT (1958) berichtet.

Untersuchungstechnik

Zellen der log-Wachstumsphase von *Bac. megaterium*, die hier ausschließlich zur Diskussion stehen sollen, wurden durch Kultur in Peptonbouillon (2,5% Pepton; 0,5% NaCl; pH 7,2) erhalten und entweder mit 1% OsO₄ in isotonischem Veronalacetat-Puffer nach SJÖSTRAND bei pH 7,2 oder in einem isotonischen OsO₄-K₂Cr₂O₇-Gemisch (1% OsO₄; 1% K₂Cr₂O₇; 2,5% Saccharose; pH 6,7; vgl. DALTON 1955, WOHLFAHRT-BOTTERMANN 1957; GRELL u. WOHLFAHRT-BOTTERMANN 1957) 1 Std lang

fixiert und die entwässerten Zellen nach Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat nach WOHLFAHRT-BOTTERMANN (1957) in Methacrylat eingeschlossen.

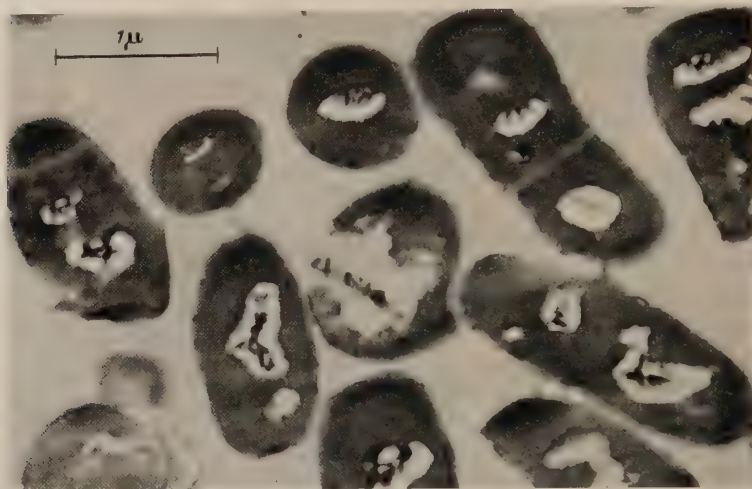


Abb. 2a. *Bac. megaterium*, sehr dicker Schnitt. P-EM

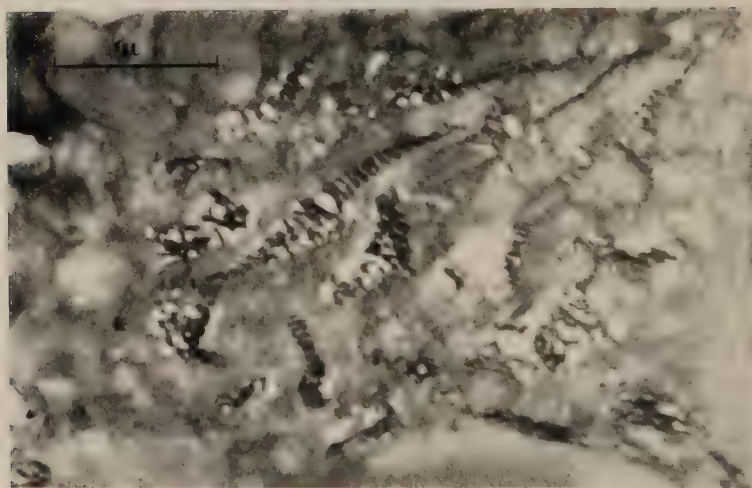


Abb. 2b. *Amphidinium elegans*, sehr dicker Schnitt. P-EM

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem 75 kV Philips-Elektronenmikroskop (P-EM) und dem Siemens-Elektronenmikroskop Typ 100d (S-EM) durchgeführt.

Herrn Prof. EYER haben wir für die Überlassung des Philips-Gerätes, für die Aufnahmen mit dem Siemens-Elektronenmikroskop Herrn Dozent Dr. WOHLFAHRT-BOTTERMANN zu danken.

Eigene Befunde

In Dünnschnitten durch *Bacillus megaterium* ließen sich, insbesondere nach Anwendung einer isotonischen Osmium-Chrom-Fixierung, in der sogenannten Kernvacuole („Kerngrundsubstanz“) Strukturen darstellen,

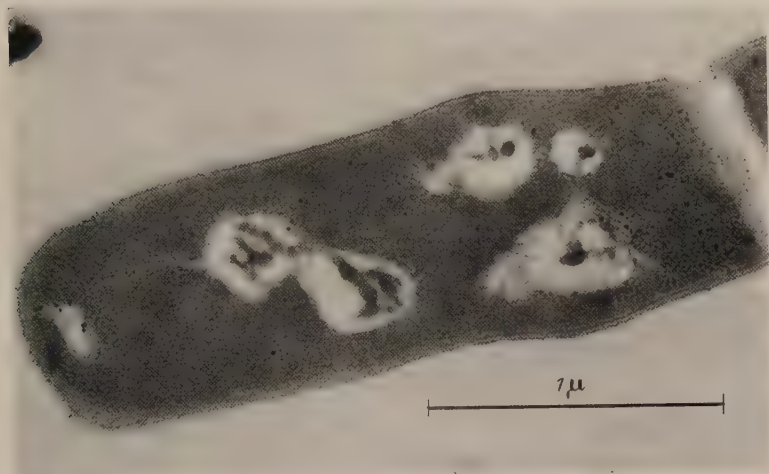


Abb. 3. *Bac. megaterium*, Dünnschnitt. S-EM

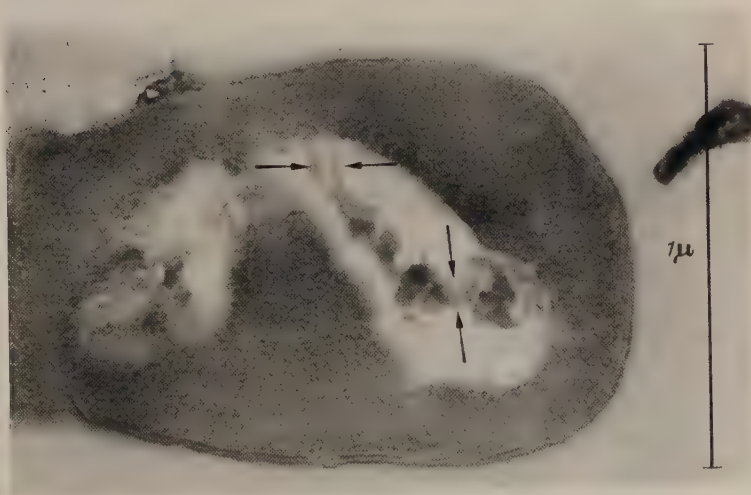


Abb. 4. *Bac. megaterium*, Dünnschnitt. S-EM

die den Eindruck von Schraubenanschnitten erweckten. Um nach Möglichkeit den räumlichen Aufbau dieser Strukturen analysieren zu können, wurde unter Verzicht auf optimale Auflösung eine solche Schnittdicke angestrebt, die gerade noch durchstrahlt werden konnte (Abb. 2a), weil

Serienschnitte allein nicht immer hinreichende Informationen liefern können (vgl. HILLIER u. GETTNER 1950; WILLIAMS u. KALLMAN 1955).

In solchen Schnitten stellte sich der Inhalt der „Kernvacuole“ von Kernen, die sich nicht teilen, als große Schraube mit bis zu 5 Windungen, einem Durchmesser von etwa 1000 Å und einer Fadendicke von etwa 300 Å dar. Aber auch in relativ dünnen Schnitten konnten dann Teile der Schraube mit Sicherheit erkannt werden (Abb. 3). Bei manchen Schnitten

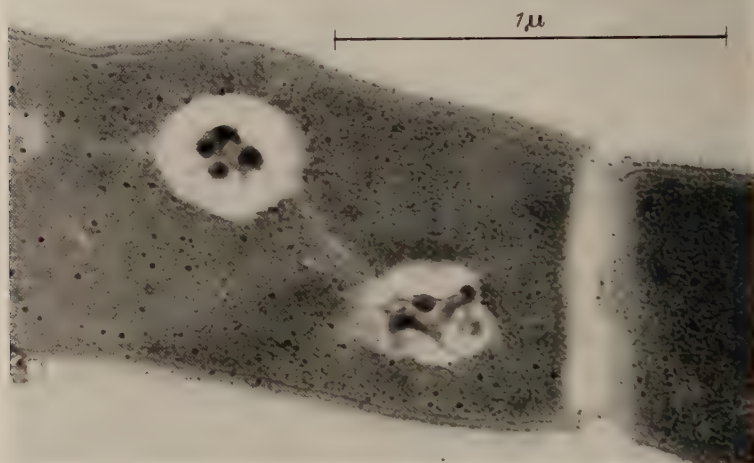


Abb. 5. *Bac. megaterium*, Dünnschnitt. S-EM

erwies sich die Großschraube deutlich als „Doppelschraube“, wobei beide offenbar wie um eine gemeinsame Achse gewunden erscheinen und auf diese Weise das Bild von zwei ineinandergeschobenen Großschrauben vermitteln (Abb. 4). In manchen Querschnitten ließen sich daher auch zwei angeschnittene Fäden darstellen; gelegentlich waren aber auch vier Anschnitte erkennbar (Abb. 5).

In einigen besonders gut aufgelösten Aufnahmen zeigte sich darüber hinaus, daß die Großschrauben von *Bac. megaterium* selbst hochgeordnete Strukturen darstellen und anscheinend aus schraubenförmigen Strukturen von makromolekularer Größenordnung aufgebaut sind (Abb. 6). Besonders deutlich ließ sich diese — vorerst als „Kleinschraube“ bezeichnete — Struktur auch in solchen Kernen beobachten, deren Großschrauben durch noch unbekannte Einwirkungen zum Teil stark aufgelockert waren, so daß die Baueinheiten der Kleinschraube deutlicher erkennbar wurden (vgl. Abb. 7). Die Anzahl der Windungen der Kleinschraube muß auf Grund von Auszählungen in einer Großschraube über 100 betragen.

Die Großschraube des Bakterienkerns, wie wir sie in relativ dicken Schnitten darstellen konnten, hat anscheinend ihre Parallele in der großschraubigen Struktur der Chromosomen des Dinoflagellaten, wie wir sie



Abb. 6. *Bac. megaterium*, Dünnschnitt, S-EM

in entsprechend dicken Schnitten erhielten (Abb. 2b). Darüber hinaus zeigte sich zwischen Bakterien und Dinoflagellaten eine bemerkenswerte weitere Parallele; denn auch die oben beschriebene Kleinschraube bei

Bac. megaterium stimmt unter gleichen Präparationsbedingungen in Form und Größenordnung mit den entsprechenden von GRELL u. WOHLFARTH-BOTTERMANN (1957) dargestellten Feinstrukturen der Dinoflagellaten-

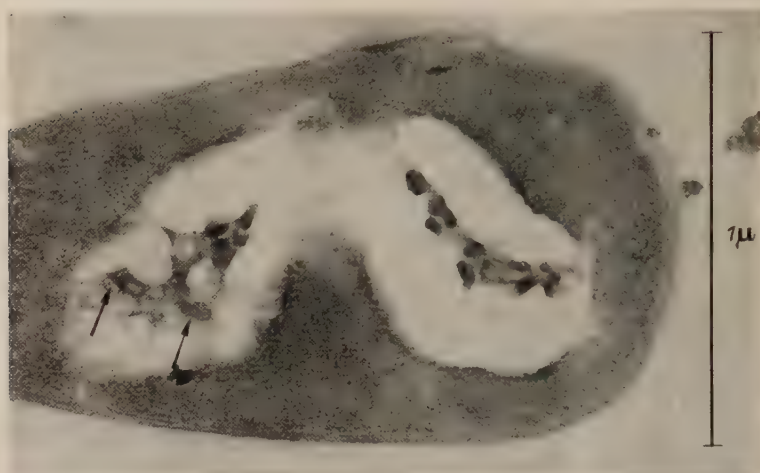


Abb. 7. *Bac. megaterium*, Dünnschnitt. S-EM

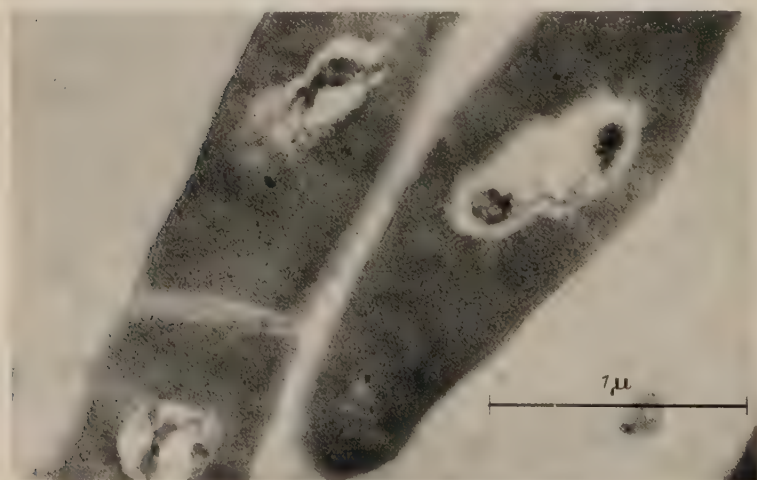


Abb. 8. *Bac. megaterium*, Dünnschnitt. S-EM

Chromosomen überraschend gut überein, wie wir in eigenen Untersuchungen bestätigen konnten.

Die oben beschriebene Großschraube entspiralisiert sich offenbar im Laufe der Kernteilung (Abb. 8; vgl. auch Abb. 2a). Dieses bemerkenswerte

Verhalten der Großschraube findet anscheinend wiederum seine Parallele in dem Formwechsel der hier vergleichend untersuchten Dinoflagellaten-Chromosomen; denn nach GRELL u. WOHLFARTH-BOTTERMANN (1957) werden lichtmikroskopischen Untersuchungen zufolge auch hier die schraubigen Chromosomen während der Kernteilung mehr oder weniger entspiralisiert, so daß die Autoren von einem „invertierten Formwechsel“ der Chromosomen sprechen.

Die Übereinstimmung zwischen den Bakterienkernen und den Dinoflagellaten-Chromosomen geht sogar so weit, daß beide unter abgewandelten Präparations-Bedingungen prinzipiell gleichartige Veränderungen aufweisen. Diese Veränderungen des Kernmaterials bestehen z. B. in einer Zerkleinerung der Großschraube von *Bac. megaterium*. Danach dürften diese noch aus fädigen, parallel zu ihrer Längsachse angeordneten Untereinheiten aufgebaut sein (GIESBRECHT 1957, SCHLOTE 1958). Ähnliche Längszerkleinerungen treten auch bei den Chromosomen der Dinoflagellaten auf, doch soll auf Einzelheiten in diesem Zusammenhang nicht eingegangen werden.

Es sei jedoch soviel erwähnt, daß es bei der üblichen Fixierung mit 1%iger isotonischer Osmium-Lösung in Veronalacetat-Puffer nur selten gelang, die Feinstrukturen des Bakterienzellkerns stabil zu erhalten. Das Cytoplasma und die Zellwand erwiesen sich jedoch gegenüber Veränderungen durch die Fixierungsmittel, den pH-Wert oder das Ionen-Milieu als relativ beständig. Bei *Bac. megaterium* könnte jedenfalls nicht davon die Rede sein, daß — wie vielfach angenommen — der Erhaltungszustand des Cytoplasmas gleichsam einen Indicator für den Gesamterhaltungszustand der Zelle darstellt. Wurde jedoch an Stelle der üblichen OsO_4 -Fixierung eine isotonische OsO_4 - $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Fixierung angewendet, so ließ sich zwar das Kernmaterial bei einem wesentlich größeren Prozentsatz der eingebetteten Bakterien stabilisieren; es war jedoch bisher noch nicht zu verhindern, daß bei unseren sehr zahlreichen Präparationen ganze Chargen aus noch ungeklärten Gründen Zerstörungen aufwiesen.

In vereinzelten Fällen wies der Kern einen zentralen Körper auf, wie er schon von KELLENBERGER u. RYTER (1955, 1956) sowie von SPIEGELMAN et al. (1958) beschrieben wurde. Über die Natur dieser Körper läßt sich aber vorerst keine Aussage machen.

Diskussion

Die in den dargelegten Befunden miteinander verglichenen Mikroorganismen, der Dinoflagellat *Amphidinium elegans* und das Bacterium *Bacillus megaterium*, enthalten Feulgen-positive Körper, wobei es sich bei den Dinoflagellaten mit Sicherheit um Chromosomen handelt. Beide Feulgen-positiven Körper weisen jedoch nicht nur hinsichtlich ihrer Morphologie, sondern auch bei ihrer Teilung und sogar in ihrem Verhalten gegenüber verändernden Präparationsbedingungen auffallende Übereinstimmungen auf (vgl. Tabelle). Daher sind wir der Ansicht, daß hier zwei

einander weitgehend entsprechende Strukturen vorliegen, d. h. daß jede „Kernvacuole“ von *Bac. megaterium* offenbar ein einziges Chromosom mit anscheinend zwei oder möglicherweise auch entsprechend mehr Chromatiden enthält.

Diese Deutung würde überraschend gut durch die bereits im Jahre 1951 publizierten, aber bisher nur wenig beachteten Untersuchungen von MARSHAK (1951 a, b) gestützt, der aus ultraschallzerstörten Zellen von

Tabelle

	<i>Bac. megaterium</i>	<i>Amphidinium elegans</i>
Feulgen-positive Körper liegen vor als	Großschrauben	Großschrauben
Feinbau der Feulgen-positiven Strukturen	Kleinschrauben in makromolekularer Größenordnung	Kleinschrauben in makromolekularer Größenordnung
„Ruhekern“	vollständig spiralisierte Großschrauben	vollständig spiralisierte Großschrauben
Kernteilung	offenbar Entspiralisierung der Großschrauben	wahrscheinlich Entspiralisierung der Großschrauben
Interphase	bisher nicht bekannt	nicht bekannt
Reaktion auf verändernde Präparationsmethoden	Zerfaserung der Großschrauben	Zerfaserung der Großschrauben

E. coli schraubige Gebilde („chromonemata“, „chromosomes“) isolieren konnte, die er vor allem auf Grund ihrer äußeren Gestalt mit Chromosomen vergleicht. Die Größenangaben für diese Strukturen liegen zwar über den gleichartigen Strukturen von *Bac. megaterium*, doch lassen sich die Werte im Hinblick auf die unterschiedlichen Präparationsmethoden nicht ohne weiteres miteinander vergleichen. Dagegen bestehen hinsichtlich der Windungszahl sowohl der Großschraube als auch der Kleinschraube weitgehende Übereinstimmungen (5,7 bzw. 106 bei *E. coli* und 5 bzw. mehr als 100 bei *Bac. megaterium*). Dadurch bekommen auch die Befunde von MARSHAK die ihnen zukommende Bedeutung (vgl. dazu auch Abb. 8a bei BRADFIELD 1956).

Damit wird auch bestätigt, daß die von uns beschriebenen Zerfaserungen der Chromosomen bei den Bakterien wie bei den Dinoflagellaten wohl weitgehend als *präparationsbedingt* angesehen werden dürfen (vgl. dazu KELLENBERGER u. RYTER 1955, 1956, NIKLOWITZ 1957, PREUSSER et al. 1958, PREUSSER 1958). Diese Auffassung wird noch durch die Befunde von SPIEGELMANN et al. (1958) gestützt, die aus isolierten Zellkernen von *Bac. megaterium* fädige Elemente gewinnen konnten, die wir für die

vollständig entspiralisierten Großschrauben halten möchten; sie berichten außerdem auch über ganz entsprechende „Zerfaserungen“. (Allerdings geben diese Autoren ihren Befunden eine von unserer Auffassung abweichende Deutung.)

Aus allen diesen Überlegungen ergibt sich, daß offenbar nicht allein der Erhaltungszustand des Cytoplasmas (siehe oben) oder die Feinheit der dargestellten Elemente, sondern *vor allem die Höhe des Ordnungsgrades der untersuchten Zellstruktur als Indicator für die Güte des Erhaltungszustandes* gelten sollte.

Diese Auffassung führte uns schon bei einem früheren Stand unserer Untersuchungen dazu, die etwa 300 Å starken Fäden *und nicht* das feinfädige „Kernmaterial“ in der „Kernvacuole“ für real zu halten. Wir deuteten sie zunächst als „chromosomale Strukturen“ (PIEKARSKI u. GIESBRECHT 1956); diese chromosomalen Strukturen dürften nicht etwa mit *mehreren* Chromosomen (PONTIERI 1956), sondern nur mit Teilen der *einen* mehr oder weniger spiralisierten Chromosomen-Großschraube identisch sein. Die von MAALØE u. BIRCH-ANDERSEN (1956) beschriebenen „tubular structures“ stellen vielleicht durch die Präparation veränderte, entspiralisierte Großschrauben dar.

Mit unserer Auffassung, daß der Kern von *Bac. megaterium* ein Chromosom enthält, stehen auch andere Befunde in Einklang. So treten unter Einwirkung des stark toxisch wirkenden „Vitalfarbstoffs“ Acridinorange bei *Bac. megaterium* „Verklebungen“ zwischen je zwei Feulgen-positiven Körpern unter Bildung „axialer Kerne“ auf (GIESBRECHT 1957), wie sie in ganz ähnlicher Weise POLITZER u. STOCKINGER (1954) bei Salamander-Larven unter Acridinorange erhielten und ebenfalls auf „Verklebungen der Chromosomenaußenzone untereinander“ zurückführten. Auch die Abhängigkeit des Spiralisierungsgrades der Chromosomen vom Ionen-Milieu und dem *pH*-Wert teilen die Chromosomen höher organisierter Zellen mit denen der Bakterien (vgl. auch WHITFIELD and MURRAY 1956). Vielleicht ist das Bakterienchromosom deshalb so empfindlich und labil, weil es anscheinend nicht durch eine typische, doppelt konturierte Kernmembran wie bei höher organisierten Zellen geschützt ist.

Über den *Teilungsmodus* lassen sich endgültige Aussagen noch nicht machen. Die vorliegenden Strukturbilder machen es zunächst wahrscheinlich, daß eine Verdoppelung des Kernmaterials im Stadium zwischen zwei Kernteilungen auftritt. Diese Deutung würde gut mit den Befunden von LARK u. MAALØE (1956) übereinstimmen, die bei *Salmonella typhimurium* eine Verdoppelung des DNS-Gehalts der Zellen in diesem Kernzustand beschrieben haben. Diese Beobachtung stimmt wiederum gut überein mit den Verhältnissen bei höher organisierten Zellen.

Über die Verteilung der DNS im Chromosom lassen sich keine endgültigen Aussagen machen. Wollte man die relativ großen Mengen an DNS morphologisch unterbringen, so müssen sie bei einer Fadendicke von 20 bzw. 40 Å infolge ihrer außerordentlichen Länge entweder schraubig aufgewunden oder gefaltet vorliegen.

Ähnliche Überlegungen haben bereits AMBROSE u. GOPAL-AYENGAR (1953), AMBROSE (1956) sowie MAALØE u. BIRCH-ANDERSEN (1956) angestellt.

Die während der Kernteilung offenbar erfolgende Entspiralisierung der Bakterien-Chromosomen und das gleichsinnige Verhalten der Chromosomen der Dinoflagellaten führt uns zu dem Schluß, daß der Kernteilungsmodus bei Bakterien ebenfalls als „invertierter Formwechsel“ der Chromosomen aufgefaßt werden darf, wie es bei den Dinoflagellaten bereits GRELL u. WOHLFAHRT-BOTTERMANN (1957) beschrieben haben. Dieser Formwechsel schließt mit Sicherheit aus, daß ein Mitosecyclus abläuft, wie er von DELAMATER (1954a, 1956) auf Grund von lichtmikroskopischen Befunden schematisch dargestellt wurde; denn eine Spiralisierung während der Teilung und ein völlig entspiralisierter Interphasekern stehen ganz im Gegensatz zu unseren Befunden. Auch die Chromosomenzahl von *Bac. megaterium*, die DELAMATER mit 3—6 angegeben hat, läßt sich mit unseren Befunden nicht in Einklang bringen. Dagegen ist sehr wahrscheinlich, daß die von ihm dargestellten Strukturen mit mehr oder weniger entspiralisierten Chromosomen oder Chromosomenteilen identisch sind, die insbesondere dann auftreten, wenn infolge von Veränderungen im Stickstoff-Kohlenstoffverhältnis des Nährbodens eine „Umschaltung“ des Stoffwechsels der Zellen eintritt (vgl. ROBINOW u. HANNAY 1953, ROBINOW 1956a, GIESBRECHT 1957).

Eine Klärung der Frage nach dem Kernteilungsmodus der Bakterien mit Hilfe von Colchicin ist schon von verschiedenen Autoren versucht worden. Während aber Colchicin bei Pflanzenzellen seine Wirkung schon in Konzentrationen von weniger als 0,01% entfaltet, waren bei Bakterien solche bis zu 5% notwendig (DELAMATER 1954b, DELAMATER et al. 1953, 1955), um „polyploide Kerne“ zu erzeugen. Diese Colchicinemengen, wie sie z. B. auch bei der Chlorophyceengattung *Oedogonium* (2%) zur Auslösung von C-Mitosen erforderlich sind, wirken wohl nicht mehr spezifisch mitosehemmend, sondern liegen wahrscheinlich bereits „über der die Zelle ganz allgemein schädigenden Konzentration“ (TSCHERMAK 1943). Daher erscheint es fraglich, ob die Colchicinversuche überhaupt wesentliche Aufschlüsse über den Teilungsmechanismus des Zellkerns der Bakterien bieten können.

Es erhebt sich nun die Frage, ob es sich bei den hier diskutierten Strukturen um einen echten Zellkern handelt, wie wir schon früher angenommen haben, oder um ein „nacktes“ Chromosom. Nun gilt als weitgehend anerkannt, daß am Aufbau des Zellkerns wenigstens vier Strukturelemente beteiligt sind, nämlich Chromosomen, Kerngrundsubstanz, Nucleolus und Kernmembran. Von diesen vier Anteilen des Zellkerns haben wir bisher weder eine typische doppelt konturierte Kernmembran noch einen Nucleolus nachweisen können. Die *typische* Kernmembran scheint uns zunächst kein unentbehrlicher Kernbestandteil zu sein. Abgesehen davon, daß eine solche auch bei dem Dinoflagellaten *A. elegans* bisher nicht nachzuweisen war, erscheint sie uns auch deshalb nicht unbedingt erforderlich zu sein, weil sie möglicherweise kaum wichtigere Funktionen zu erfüllen hat als die eines mechanischen Schutzes

für den wohl wesentlichsten Teil der Zelle, den Chromosomenapparat. Dafür spricht, daß die Membran bei Kernen höher organisierter Zellen — zumindest in einigen Fällen — eine relativ grobe regelmäßige Perforation aufweist.

Was den Nucleolus betrifft, so scheint er bei den höher organisierten Zellen vielfach ein regelmäßiger Bestandteil des Zellkerns zu sein. Doch kann er z.B. bei den Protozoen eine recht wechselnde Ausprägung erfahren, so daß z.B. GRELL (1956) nicht mehr ausschließlich vom Nucleolus, sondern auch von Nucleolarsubstanz spricht, die sogar fehlen oder jedenfalls abgebaut sein kann. Der morphologische Nachweis eines Nucleolus im Zellkern kann daher keine unabdingbare Forderung mehr sein, zumal der Nucleolus in typischer Ausbildung hauptsächlich in echten Interphasekernen zu finden ist, die bei *Bac. megaterium* — wenigstens während der log. Wachstumsphase — offenbar nicht vorliegen. Hinzu kommt, daß als wesentlichste Substanz des Nucleolus bzw. der Nucleolarsubstanz die RNS gilt; diese aber wurde kürzlich von SPIEGELMAN et al. (1958) bei *Bac. megaterium* zu einem auffallend hohen Prozentsatz in isolierten Zellkernen festgestellt (Verhältnis DNS : RNS : Eiweiß = 1 : 1 : 3).

Aus dieser Überlegung heraus ergibt sich, daß nicht alle bisher als charakteristisch angesehenen Bauelemente eines Zellkerns, nämlich die Chromosomen, die Kerngrundsubstanz, der Nucleolus und die doppelt konturierte Kernmembran, vorhanden sein müssen, um ein Zellorganell als Nucleus anzuerkennen. Auf Grund obiger Darlegungen wäre deshalb folgende Definition eines Zellkerns vorzuschlagen: *Als Nucleus gilt das in Einzahl notwendig vorhandene Organell vermehrungsfähiger Zellen (oder „Energiden“) mit der Fähigkeit zu identischer Reduplikation, das in morphologischer Hinsicht zumindest ein oder mehrere Chromosomen als Träger genetischer Funktionen in der gegen das Cytoplasma deutlich abgegrenzten Kern-Grundsubstanz, in chemischer Hinsicht wenigstens DNS, RNS und Eiweiß enthält.*

Diese Definition berücksichtigt vor allem die vielfältigen Kernverhältnisse bei den Protozoen und stellt nur noch die allein als wesentlich angesehenen Kennzeichen eines Zellkerns in den Vordergrund, ohne dabei den Kernen höher organisierter Zellen Zwang anzutun. Die cytologischen Befunde, die wir bei *Bac. megaterium* erheben konnten, fügen sich ohne Schwierigkeiten in diese Definition ein. Danach dürfte auch *Bac. megaterium* einen echten Nucleus besitzen und damit wohl den Organismus mit dem einfachsten Kerntyp und mit der geringsten Chromosomenzahl darstellen, der gleichzeitig wahrscheinlich die kleinsten Chromosomen aufweist, die bisher im Pflanzen- und Tierreich bekannt geworden sind.

Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß wir *Bac. megaterium* ursprünglich als „Bakterienmodell“ ansahen. Es liegen aber keine Gründe dafür vor, diese

Bakterienart für einen Sonderfall zu halten; vielmehr dürfte sicher sein, daß bei anderen Eubakterien ganz ähnliche cytologische Verhältnisse herrschen; dafür sprechen vor allem auch die Befunde von MARSHAK (1951a, b) bei *E. coli*.

Mit dieser Erkenntnis würde sich der Kreis der bisher bekannten Chromosomen-tragenden Organismen um einen wesentlichen Bereich erweitern, und es beständen zwischen der Zelle der höheren Organismen und der Bakterienzelle keine prinzipiellen Unterschiede mehr. Das würde weiterhin bedeuten müssen, daß die bisher an den DNS-haltigen Strukturen der Bakterien erhaltenen Ergebnisse als Ergebnisse an Chromosomen anzusehen sind. Dabei erhebt sich vor allem die Frage, ob die bisher auf Bakterien beschränkten als „Sonderfälle“ angesehenen Erscheinungen, wie z. B. der Phagenwirkung, der Transformation und der Transduktion, möglicherweise geeignet sind, allgemeine Aussagen über die Chromosomennatur zu vermitteln.

Zusammenfassung

Vergleichende Untersuchungen an Dünnschnitten durch *Bacillus megaterium* und den Dinoflagellaten *Amphidinium elegans* ließen folgende Aussagen über die Struktur des Kernmaterials der Bakterien zu:

1. *Bac. megaterium* enthält zwischen zwei Kernteilungen in der vom Cytoplasma umgebenen Kerngrundsubstanz je ein einziges vollständig spiralisiertes Chromosom mit anscheinend zwei oder entsprechend mehr Chromatiden, wobei die Chromosomenschraube selbst wiederum einen offenbar schraubigen Aufbau in makromolekularer Größenordnung aufweist.

2. Bei der Teilung der Chromosomen von *Bac. megaterium* erfolgt ebenso wie wahrscheinlich bei dem Dinoflagellaten eine Entspiralisierung, so daß man wohl auch bei Bakterien von einem „invertierten Formwechsel“ der Chromosomen sprechen kann.

3. Ausgehend von den vielfältigen Kernverhältnissen bei den Protozoen wird eine Kerndefinition vorgeschlagen, die nur noch die als unbedingt notwendig angesehenen Kernanteile in den Vordergrund stellt. In diese Definition fügen sich die bei *Bac. megaterium* vorgefundenen cytologischen Verhältnisse zwanglos ein und stützen die damit schon früher vertretene Auffassung von der Existenz eines echten Zellkerns bei Bakterien.

4. Es werden in diesem Zusammenhang prinzipielle Überlegungen zur Beurteilung des Erhaltungszustandes ultradünner Schnitte angestellt.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Den medizinisch-technischen Assistentinnen Fräulein I. KOHL und Fräulein E. GÖPFERT danken wir für ihre Mitarbeit.

Literatur

- AMBROSE, E. J.: Prog. Biophysics a. Biophysical. Chem. **6**, 26—55 (1956). —
 AMBROSE, E. J., and A. R. GOPAL-AYENGAR: Heredity **6** Suppl., 277—292 (1953).
 BAKER, R. F., and D. C. PEASE: Nature (Lond.) **163**, 282 (1949). — BISSET,
 K. A.: The Cytology and Life-History of Bacteria. Second Edition. Edinburgh and

London 1955. — Erg. Mikrobiol. **30**, 1—36 (1957). — BRADFIELD, J. R. G.: Proc. 3. Internat. Conf. Electron Microscopy, 321—327 (1956). London 1954.

DALTON, A. J.: Anat. Rec. **121**, 281 (1955). — DELAMATER, E. D.: Ann. Rev. Microbiol. **8**, 23—46 (1954a). — J. Histochem. Cytochem. **2**, 459—460 (1954b). — Symp. Soc. Gen. Microbiol. **6**, 215—260 (1956). — DELAMATER, E. D., M. E. HUNTER and E. MINSAVAGE: Atti VI. Congr. Internat. Microbiol. Rom, **1**, 83—85 (1953). — DELAMATER, E. D., M. E. HUNTER, W. SZYBALSKI and V. BRYSON: J. gen. Microbiol. **12**, 203—212 (1955).

GIESBRECHT, P.: Dissert. Math.-Naturw. Fakultät. Univ. Bonn, 1957. — Vortrag, gehalten auf der 6. Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene, Semmering 1958. — Naturwissenschaften (im Druck). — GRELL, K. G.: Protozoologie. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1956. — GRELL, K. G., u. K. E. WOHLFAHRT-BOTTERMANN: Z. Zellforsch. **47**, 7—17 (1957). — GUHA, A., N. N. DASGUPTA and M. L. DE: J. Bact. **67**, 292—294 (1954).

HILLIER, J., and M. E. GETTNER: J. appl. Phys. **21**, 889—895 (1950).

KELLENBERGER, E., et A. RYTER: Schweiz. Z. allg. Path. **18**, 1122—1137 (1955). — Experientia (Basel) **12**, 420—423 (1956). — KNAYS, G.: Euclides (Madrid) **14**, 205—211 (1954). — J. Bact. **69**, 117—129 (1955). — Ann. Rev. Microbiol. **10**, 253—274 (1956).

LARK, K. G., and O. MAALØE: Biochim. biophys. Acta **21**, 448—458 (1956).

MAALØE, O., and A. BIRCH-ANDERSEN: Symp. Soc. Gen. Microbiol. **6**, 261—278 (1956). — MARSHAK, A.: Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **37**, 38—41 (1951a). — Exp. Cell Res. **2**, 243—251 (1951b).

NIKLOWITZ, W.: Electron Microscopy, 115—116 (1957). Stockholm 1957.

PELS-LEUSDEN, F., u. H. FREYMARK: Naturwiss. Rundschau **9**, 102—105 (1956). — PIEKARSKI, G.: Arch. Mikrobiol. **8**, 428—438 (1937). — Naturwissenschaften **37**, 201—205 (1950). — PIEKARSKI, G., u. P. GIESBRECHT: Naturwissenschaften **43**, 89—90 (1956). — POLITZER, G., u. L. STOCKINGER: Z. Zellforsch. **41**, 186—202 (1954). — PONTIERI, G.: G. Microbiol. **1**, 367—374 (1956). — PREUSSER, H.-J.: Vortrag, gehalten auf der 6. Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene. Semmering 1958. — Arch. Mikrobiol. **29**, 17—37 (1958). — PREUSSER, H.-J., F. W. SCHLOTE u. A. RIPPPEL-BALDES: Naturwissenschaften **44**, 186—187 (1957).

ROBINOW, C. F.: J. Hyg. (Lond.) **43**, 413—423 (1944). — Symp. Soc. Gen. Microbiol. **6**, 181—214 (1956). — Bact. Rev. **20**, 207—242 (1956). — ROBINOW, C. F., and C. L. HANNAY: Atti VI. Congr. Internat. Microbiol., Rom, **1**, 67—68 (1953).

SCHLOTE, F. W.: Vortrag, gehalten auf der 6. Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene. Semmering 1958. — SPIEGELMAN, S., A. I. ARONSON and P. C. FITZ-JAMES: J. Bact. **75**, 102—117 (1958).

TSCHERMAK, E.: Chromosoma (Berl.) **2**, 493—518 (1943).

WHITFIELD, J. F., and R. G. E. MURRAY: Canad. J. Microbiol. **2**, 245—260 (1956). — WILLIAMS, R. C., and F. KALLMAN: J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 301—314 (1955). — WOHLFAHRT-BOTTERMANN, K. E.: Naturwissenschaften **44**, 287—288 (1957).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen)

Über die Beeinflussung niederer Erdphycomyceten durch Flechten*

Von

R. HARDER und E. UEBELMESSER

(Eingegangen am 4. März 1958)

Bei den Untersuchungen über die Häufigkeit der Chytridineen und anderer niederer Erdphycomyceten haben sich außerordentlich große Unterschiede zwischen den einzelnen Arten ergeben (vgl. z. B. SOERGEL 1941, GAERTNER 1954, HARDER u. UEBELMESSER 1955, u. a.). Über die Ursachen dafür wissen wir noch nicht viel; zu denken ist an verschiedene Vermehrungsintensität, unterschiedliche Resistenz gegen verschiedenste ungünstige Außenfaktoren u. a. m. Zu den beeinflussenden Faktoren könnten an entsprechenden Standorten u. U. wohl auch Ausscheidungen von Flechten gehören.

Nachstehend soll daher kurz über das Vorkommen niederer Erdphycomyceten an Standorten mit Flechten sowie über den Einfluß von Flechtenzusätzen zu Köderansätzen von Erdproben mit bekanntem Gehalt an niederen Boden-Phycomyceten berichtet werden.

1. Methodik

Das auf seinen Phycomycetengehalt zu untersuchende Material wurde in der üblichen Weise (vgl. z. B. SOERGEL 1941, GAERTNER 1954) in Petrischalen in Wasser aufgeschwemmt und mit Ködern (*Pinus*-Pollen, Ameisenpuppen, Lein- und Hanfsamen, Fliegenbeine und -flügel, Cellophanstückchen, Kuhhaare und Krabbenchitin) beschickt. Die Köder wurden nach 5, 10 und 20 Tagen durchmikroskopiert.

2. Pilzgehalt des Bodens unter Flechten

Bei der Beköderung von Erde, die unter drei alpinen Flechten herausgekratzt worden war, wurden in 25 Ansätzen höchstens Fadenpilze und nur in einem einzigen Fall *Karlingia rosea* festgestellt. An nahegelegenen flechtenfreien Standorten kamen mehrere niedere Phycomyceten vor.

Ebenso wenig positiven Erfolg hatte ein Versuch, bei dem der Boden unter Göttinger Flechten zusammen mit zerkleinerten Stücken der Flechte selbst im Wasser aufgeschwemmt und beködert wurde. Von jeder Flechte (*Pertusaria* spec., *Physcia* spec., *Lecanora* spec. und zwei nicht bestimmte Krustenflechten) wurden drei Ansätze, im ganzen also 15, gemacht. Bei *Pertusaria* und *Lecanora* entwickelten sich auf den Ködern in je einem Fall septierte Hyphen, und bei einer der Krustenflechten trat einmal ein *Olpidium* auf.

Die Flechten scheinen also die Entwicklung der Pilze in der Natur stark zu unterdrücken.

* Herrn Professor Dr. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

3. Einfluß von Flechtenzusätzen zu Bodenproben von Nichtflechtenstandorten mit niederen Erdphycomyceten

Die Erdmengen unter Flechten sind meistens sehr spärlich, so daß es schwierig ist, die für die Beköderungsansätze erforderlichen Mengen zu bekommen. Deshalb wurde bei der Fortsetzung der Versuche Erde anderer Herkunft mit bekanntem Gehalt an niederen Erdphycomyceten benutzt; sie wurde normal aufgeschwemmt und beködert, aber zusätzlich mit 1 cem in der Reibschale zermörserter Flechten versetzt.

a) *Flechtengemische*. Bei den ersten Versuchen wurden natürliche Flechtengemische verwandt, so wie sie in der Natur durcheinandergewachsen waren. Das *I. Gemisch* enthielt in der Hauptmasse (mehr als 50%) *Parmelia caperata* und außerdem *P. scortea* und *P. dubia*. Im *II. Gemisch* dominierte *P. physoides* gegenüber *P. sulcata* und *Evernia prunastri*, und im *III. Gemisch* war *P. scortea* die vorherrschende Art neben *P. caperata* und *P. dubia*.

Die in der Reibschale zerriebenen Gemische wurden zu folgenden Bodenproben hinzugesetzt: 1. Erde aus dem Botanischen Garten in Göttingen. In den Kontrollansätzen ohne Flechten fanden sich in ihr *Olpidium pendulum*, *Rhizophydium sphaerotheca*, *Rh. subangulosum*, *Rh. carpophilum*, *Phlyctochytrium biporosum*, *Ph. n. sp.* REINBOLDT, *Karlingia rosea* und *Novakowskiella elegans*. Die 2. Erdprobe stammte aus Afrika (GAERTNER 1954, Nr. 108 WA); aus ihr wurden in den Kontrollen herausgeködert *Olpidium pendulum*, *Rhizophydium globosum*, *Rh. sphaerotheca*, *Rh. carpophilum*, *Rh. spec. 1*, *Rh. spec. 2*, *Phlyctochytrium africanum*, *Ph. spec. 2a*, *Karlingia rosea* und *Allomyces arbuscula*. Die 3. Erdprobe war ebenfalls aus Afrika (GAERTNER, Nr. 182 SA) und ergab in den Kontrollen *Olpidium pendulum*, *Rhizophydium sphaerotheca*, *Phlyctochytrium africanum*, *Ph. spec. a* und *Karlingia rosea*. Die Ansätze wurden nur je einmal gemacht.

Die Zahl der sich auf den Ködern ansiedelnden Pilze wurde durch den Zusatz der Flechtengemische stark herabgesetzt (Tab.1). Von den 8 Arten der Göttinger Gartenerde traten im Mindestfall nur 2 Arten auf, von den 5 Arten des einen afrikanischen Bodens blieben nur 2 übrig und von den 10 der anderen afrikanischen Erde wurde nach Zusatz von Flechtengemisch II sogar nur eine einzige Art wiedergefunden.

Die drei Böden enthielten, wie gesagt, nicht die gleichen Pilze. Nur 3 Arten waren in ihnen allen vorhanden, nämlich *Olpidium pendulum*,

Tabelle 1. Zahl der Arten niederer Erdphycomyceten in drei verschiedenen Bodenproben mit und ohne Zusatz von Flechtengemischen

Flechtengemisch	Boden 1	Boden 2	Boden 3
I	4	2	2
II	2	1	2
III	2	3	2
Kontrolle	8	10	5

Rhizophydium sphaerotheca und *Karlingia rosea*. Von ihnen war *Karlingia rosea* am empfindlichsten; sie trat in keinem der Köderansätze mit Flechtengemischzusatz mehr auf (Tab. 2).

Rhizophydium sphaerotheca kam noch in vier der neun Kombinationen zur Entwicklung. *Olpidium pendulum* wurde noch aus fünf der Ansätze wieder herausgefunden, darunter aus allen dreien mit Gemisch II. Von den Arten, die wenigstens

Tabelle 2. Wirkung der drei Flechtengemische auf fünf verschiedene Erdphycomyceten, von denen die ersten drei in allen drei Erdproben, die letzten beiden nur in zweien vorhanden waren

—: der Pilz trat infolge des Zusatzes der Flechtengemische nicht mehr auf; +: er war noch vorhanden; 0: er fehlte von Anfang an in der betreffenden Erde

	Gemisch I			Gemisch II			Gemisch III		
	Erde			Erde			Erde		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1. <i>Olpidium pendulum</i>	—	—	+	+	+	+	—	+	—
2. <i>Rhizophydium sphaerotheca</i>	+	+	—	—	+	—	—	—	+
3. <i>Karlingia rosea</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4. <i>Rhizophydium carpophilum</i>	+	0	+	—	0	—	—	0	—
5. <i>Phlyctochytrium africanum</i>	0	—	—	0	—	—	0	+	+

in zwei der Erdproben vorhanden waren, wurden *Rhizophydium carpophilum* nur noch in Gemisch I, *Phlyctochytrium africanum* nur noch in Gemisch III wieder gefunden.

Diese besondere Wirksamkeit bzw. Unwirksamkeit gewisser Gemische dürfte auf Zufall beruhen. Denn in Mischung II, die auf *Olpidium pendulum* wirkungslos war, war der Hauptbestandteil *Parmelia physoides*; bei den gleich zu erörternden Versuchen mit Einzelflechten wurde *Olpidium pendulum* aber gerade durch diese Flechte in zweien der drei Versuche ausgemerzt.

Von den Arten, die nur in einem der Böden vorhanden waren, fand sich nur eine (*Olpidium luxurians*) in den Ansätzen mit zwei Gemischen wieder (I und II), vier in denen mit nur einem (nämlich *Rhizophydium subangulosum*, *Phlyctochytrium* n. sp. REINBOLD und *Phl. spec. a* in Mischung I, sowie *Rhizophydium spec. 1* in Mischung III), die übrigen traten in den Schalen mit Flechtengemischzusatz überhaupt nicht wieder auf. Da es sich um seltenere Arten handelt, die auch ohne Flechtenzusatz durchaus nicht in jedem Ansatz gefunden werden, so darf man daraus noch nicht auf eine besonders hohe Empfindlichkeit gegen die Flechten schließen.

Die sämtlichen Erdphycomyceten wurden also durch Flechtengemische stark in ihrer Entwicklung gehemmt.

b) *Einzelflechten*. Nun wurden auch noch Versuche mit Zusatz von Einzelflechten, nämlich *Parmelia dubia*, *P. physoides*, *P. caperata*, *Cladonia pyxidata*, *Cl. coniocraea* und *Xanthoria parietina* gemacht. Auch in diesen Versuchen wurde die Zahl der Pilze reduziert und zwar im Mittel auf 70%, im Extrem auf 50%. Auch hier wirkten die Flechten also hemmend, wenn auch nicht ganz so stark wie die Gemische. Darauf kann aber kein großes Gewicht gelegt werden, weil bei der geringen Zahl der

Ansätze die Streuung immer sehr groß ist. Die besonders starke Empfindlichkeit von *Karlingia rosea*, die sich in den Versuchen mit den Gemischen ergeben hat, war gegenüber den Einzelflechten nicht ausgeprägt. Auch keiner der anderen Pilze zeigte eine besonders starke Empfindlichkeit oder auch Widerstandsfähigkeit gegen die Einwirkung der Flechten. Die Versuche mit den Einzelflechten haben daher keine Einblicke gegeben, die über die schon bei den Flechtengemischen gemachten hinausgingen.

4. Diskussion

Daß Außenfaktoren auf verschiedene Arten niederer Phycomyceten verschiedene Wirkung haben können, ist erst in einer noch nicht großen Zahl von Beispielen gezeigt worden. Zu den Faktoren, die für solche Einflüsse in Frage kommen, gehören die Salzkonzentration des Mediums (GAERTNER 1954, HARDER u. UEBELMESSER 1955, SCHOLZ 1958, HÖHNK 1956 II), extrem niedere Temperatur (REMY 1950), Ausscheidungen von Stoffen höherer Pflanzen in den Erdboden (REINBOLDT 1951), klimatische, edaphische und jahreszeitliche Verhältnisse (GAERTNER 1954, HARDER 1954, PERSIEL 1958, HÖHNK 1956 I) u. a. m. Zu ihnen tritt nach den vorstehenden Untersuchungen noch eine von Flechten ausgehende Wirkung.

Daß die Flechten sowohl niedere wie höhere Gewächse in ihrer Entwicklung beeinflussen, ist aus zahlreichen Arbeiten bekannt (z. B. STOLL 1947, KLOSA 1949, BURZLAFF 1950, BUSTINZA 1951, DES ABBAYES 1953, SCHATZ u. Mitarb. 1956). Die vorstehenden Versuche zeigen, daß auch die niederen Phycomyceten solchen Einflüssen unterliegen. Wir lernen damit also einen weiteren beeinflussenden Faktor kennen, wenn er auch wohl sicherlich keine große Rolle für die Verteilung der in Frage stehenden Pilze in der Natur spielen kann. Sicher ist jedoch, daß eine Hemmung des Wachstums der niederen Erdphycomyceten durch Flechten stattfindet. Wie weit dabei die einzelnen Pilzarten besonders empfindlich oder auch resistent sind, kann erst durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Zusammenfassung

Aus dem spärlichen Boden unter Flechten ließen sich nur in sehr seltenen Fällen vereinzelte niedere Erdphycomyceten herausködern.

Bei Zusatz von zerkleinerten Flechten zu Aufschwemmungen von Erdboden mit bekanntem Phycomycetengehalt wurden die hinzugegebenen Köder in sehr viel geringerem Maße besiedelt als ohne Flechtenzusatz.

Eine besondere Empfindlichkeit bestimmter Pilzarten gegen die von den Flechten ausgehende Wirkung konnte nicht ermittelt werden.

Literatur

ABBAYES, H. DES: Travaux sur les Lichens parus de 1939 à 1952. Bull. Soc. bot. France **100**, 83—123 (1953).

BURZLAFF, D. F.: The effect of extracts from the lichen *Parmelia molliuscula* upon seed germination and upon the growth rate of fungi. Journ. Colorado-Wyoming

Acad. Sci. **4**, 56 (1950). — BUSTINZA, F.: Antibakterielle Stoffe in Flechten. *Endeavour* (deutsche Ausgabe) **10**, 95 (1951).

GAERTNER, A.: Über das Vorkommen niederer Erdphycomyceten in Afrika, Schweden und an einigen mitteleuropäischen Standorten. *Arch. Mikrobiol.* **21**, 4 (1954).

HARDER, R.: Über die arktische Vegetation niederer Phycomyceten. *Nachr. Akad. d. Wiss. Göttingen. Math.-phys. Kl. IIb, Biol.-physiol.-chem. Abt. Nr. 1* (1954). — HARDER, R., u. E. UEBELMESSER: Über marine saprophytische Chytridiales und einige andere Pilze vom Meeresboden und Meeresstrand. *Arch. Mikrobiol.* **22**, 87 (1955). — HÖHNK, W.: Mykologische Abwasserstudie I. Veröff. *Inst. Meeresforsch. Bremerhaven* **4**, 67 (1956 I). — HÖHNK, W.: Studien zur Brack- und Seewassermykologie VI. Über die Besiedlung verschieden salziger submerser Standorte. Veröff. *Inst. f. Meeresforsch. Bremerhaven* **4**, 195 (1956 II).

KLOSA, J.: Evosin, ein neues Antibioticum aus Flechten. *Dtsch. Gesundh.-Wes.* **1949**, 16.

PERSIEL, I.: Über Verbreitung niederer Phycomyceten im Gebirge. *Arch. Mikrobiol.* (erscheint demnächst).

REINOLDT, B.: Über die Verteilung einiger niederer Phycomyceten im Erdboden. *Arch. Mikrobiol.* **16**, 177 (1951). — REMY, E.: Über niedere Bodenphycomyceten. *Arch. Mikrobiol.* **14**, 212 (1950).

SCHATZ, V., A. SCHATZ, G. S. TRELAWNY and K. BARTH: Significance of Lichens as pedogenic agents. *Proc. Pennsylvania Acad. Sc.* **30**, 62 (1956). — SCHOLZ, E.: Über niedere Phycomyceten aus Salzböden und das Verhalten in Salzlösungen. *Arch. Mikrobiol.* **30**, 119 (1958). — SÖRGEL, G.: Über die Verbreitung einiger niederer Phycomyceten in Erden Westindiens. *Beih. Bot. Cbl.* **61**, Abt. B, 1 (1941). — STOLL, A., J. RENZ u. A. BRACK: Antibiotica aus Flechten. *Experientia* (Basel) **3**, 111 (1947).

UEBELMESSER, E.: Über einige neue Chytridineen aus Erdboden (*Olpidium*, *Rhizophidium*, *Phlyctochytrium* und *Rhizophlyctis*). *Arch. Mikrobiol.* **25**, 307 (1956).

(The Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, and The Tokugawa
Institute for Biological Research, Tokyo)

The Role of Sulfur in the Cell Division of *Chlorella**

By

EIJI HASE, YUJI MORIMURA, SAYOKO MIHARA and HIROSHI TAMIYA

With 6 figures in the text

(Eingegangen am 14. April 1958)

Introduction

In our previous work (HASE, MORIMURA and TAMIYA 1957) using the technique of synchronous culture, modifications of the life cycle of *Chlorella* caused by the deficiency of each major element (N, P, Mg, K and S) were studied, and it was revealed that the effect of S-deficiency was unique in causing complete cessation of *cellular* division, i. e., division and separation of newly formed daughter cells with the rupture of mother cells. When the "dark cells" (smaller and strongly photosynthesizing cells), which had been grown in a normal nutrient medium, were further grown synchronously in an S-deficient medium under photosynthesizing conditions, the cells were able to grow to some extent, showing some increase of DNA-content followed by the division of nucleus into two. At this stage, however, the cells were stalemated, being unable to perform cellular division. When such cells were transferred to a medium containing potassium sulfate only, further synthesis of DNA and other cellular substances as well as the division of nuclei occurred, but the cells remained still incapable of performing cellular division. The cellular division of such cells could be evoked by supplying to the cells nitrate and sulfate simultaneously under photosynthesizing conditions. It thus became possible to separate the processes of *nuclear* and *cellular* division by controlling the supply of sulfur and nitrogen sources to the cells that had previously been made deficient of sulfur. It is the purpose of this paper to describe data which were obtained with such experimental arrangement and to present evidence showing an important role played by sulfur in the process of DNA-formation and nuclear division as well as in the process of cellular division of *Chlorella*.

Methods

The experimental organism was *Chlorella ellipsoidea*, and the culture methods used were virtually the same as those reported previously (TAMIYA et al. 1953, IWAMURA et al. 1955, HASE et al. 1957). The starting material used for the synchronous culture were "dark cells" of 2.6—3.2 μ in diameter, which had been precultured

* Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

with standard (complete) medium¹ at 25°. The synchronous cultures were run at 15°–16° with the provision of the light of 10 kilolux in intensity. Except in the experiments under CO₂-free conditions, the cultures were constantly aerated with air containing 5 percent CO₂. To determine the quantity of nuclear substances at various stages of cell development, nucleic acids contents of cells were measured by the method previously reported (IWAMURA et al. 1955), and in some experiments the FEULGEN staining of cells was performed to determine the number of nuclei contained in each cell².

Experimental Results

1. Cessation of cell division caused by S-deficiency and its resumption in complete medium

When the "dark cells", precultured in the standard medium, were cultured synchronously in an S-deficient medium (with provision of all other nutrients as well as CO₂ and light), they grew up to some extent.

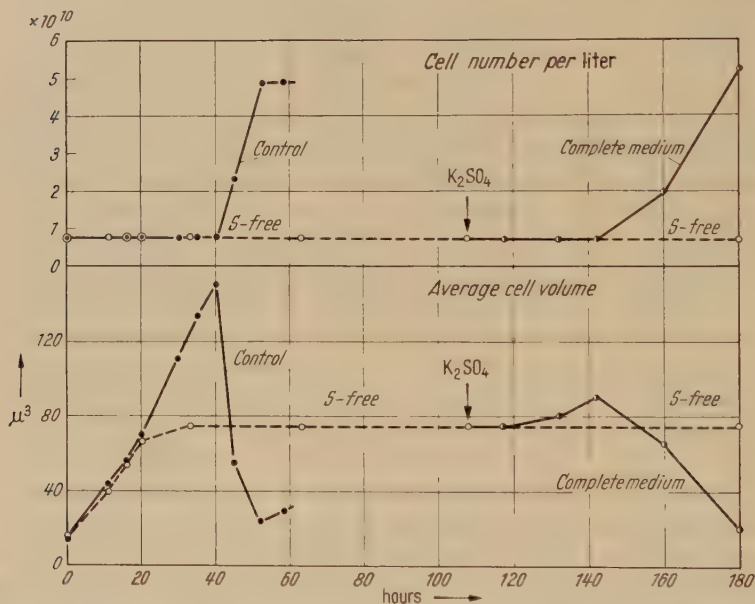


Fig. 1. Cessation of cell division caused by S-deficiency and its resumption in complete medium

¹ The standard medium used was of the following composition; per liter: KNO₃ 5.0 gm., MgSO₄ · 7 H₂O 2.5 gm., KH₂PO₄ 1.25 gm., FeSO₄ · 7 H₂O 0.003 gm., ARNON's "A5" solution 1 ml. (ARNON 1938). The S-free medium was prepared by replacing MgSO₄ and FeSO₄ in the standard medium with Mg(NO₃)₂ and FeCl₂, respectively, so as to make the concentration of corresponding cations remained the same. The pH of both standard and S-free media was adjusted to 5.2 by the addition of 1 N KOH solution.

² Exact counting of the number of stained particles (nuclei) was, however, rather difficult in the case of very small cells.

The cells were, however, incapable of cell division¹, whereas the control cells grown in the standard medium divided normally after attaining the stage of "light cells". The course of events occurring in these two cases are illustrated in Fig. 1. At the 108th hour of the culture in the S-deficient medium, potassium sulfate was added to make the medium "complete". After an induction period lasting about 30 hours, the cells resumed the process of life cycle and divided. In this case, however, the size of the cells immediately prior to the cell division was considerably smaller than that observed in the control experiment. The multiplication number, i. e., the average number of daughter cells produced from one mother cell, was 6.5, while it was 6.0 in the control experiment².

By performing a similar experiment, the change of nucleic acids content in cells at various developmental stages was followed (see Fig. 2). At the start of S-deficient culture, there occurred a relatively rapid synthesis of both DNA and PNA, which came to a stand-still after about 10—20 hours. The level of DNA (per cell) at this stage was approximately twice as high as that of starting cells, although the FEULGEN staining revealed that each cell contained only one nucleus. On prolonged culture in the S-deficient medium, the number of stained particles per cell increased

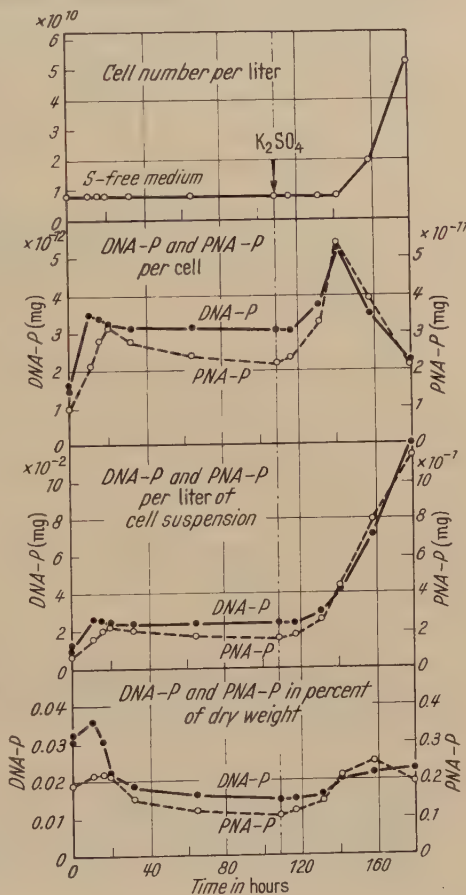


Fig. 2. Changes in nucleic acids contents of cells grown first in S-deficient medium and later in complete medium (under photosynthesizing conditions)

¹ When the "dark cells" of the dimension larger than $2.6\text{--}3.2\ \mu$ were used as the starting material of S-deficient culture, they divided partially under prolonged incubation in S-free medium. This may be due to the situation that the larger "dark cells" contained a higher amount of sulfur reserve than the smaller "dark cells".

² In other experiments, not reproduced here to save space, it was revealed that sulfate in a concentration of as low as 10^{-5} mole per liter was effective in provoking the cell division which had been halted by S-deficiency.

to two, while the level of DNA remained practically unaltered; in the meantime the level of PNA gradually decreased. At the 108th hour of the S-deficient culture potassium sulfate was added to make the medium "complete". After an induction period of about 10 hours, there occurred a rapid formation of DNA and PNA and the cell division began at the 140th hour. The cells produced by the cell division showed somewhat higher DNA level (per cell) compared with that of starting "dark cells".

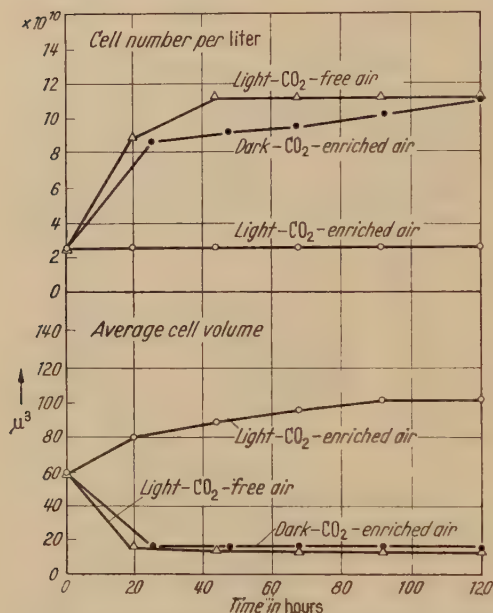


Fig. 3. Suppressing effect of photosynthesis upon the resumption of cellular division caused by the supply of sulfate to S-deficient cells. The cells grown under S-deficient condition were suspended in a solution containing K_2SO_4 only, and kept under photosynthesizing and non-photosynthesizing conditions, respectively

2. Restoration of cell-dividing capacity of S-deficient cells by subsequent provision of sulfate only (under non-photosynthesizing conditions)

The S-deficient cells, which had been cultured in the S-free medium for a sufficient length of time, were washed three times with distilled water and then incubated in a medium containing potassium sulfate only. As may be seen from the results presented in Fig. 3, the cells divided rapidly under non-photosynthesizing conditions (in the absence of either CO_2 or light), but not under photosynthesizing conditions (in the presence of both

CO_2 and light)¹. Analysis of nucleic acids showed that under non-photosynthesizing conditions a considerable increase of DNA-content (but only a slight increase of PNA) took place prior to the occurrence of cell division. The multiplication number obtained under non-photo-

¹ In our preceding paper (HASE et al. 1957) it was reported that the S-deficient and non-dividing cells could not divide in the dark even when they were provided with complete nutrients, a statement that may appear contradictory to the present one. Later experiments have revealed that when the cells were dark-incubated in a medium containing nitrate, there occurred a formation and accumulation of nitrite in the medium, and that nitrite exerted an inhibitory effect upon the process of cell division. The phenomenon observed in our earlier work might have been caused by this effect of nitrite.

synthesizing conditions was about 4, and the resulting daughter cells showed a DNA-level (per cell) approximately equal to that of starting "dark cells". The cells which were made incapable of cell division under photosynthesizing conditions showed appreciable growth in cell size

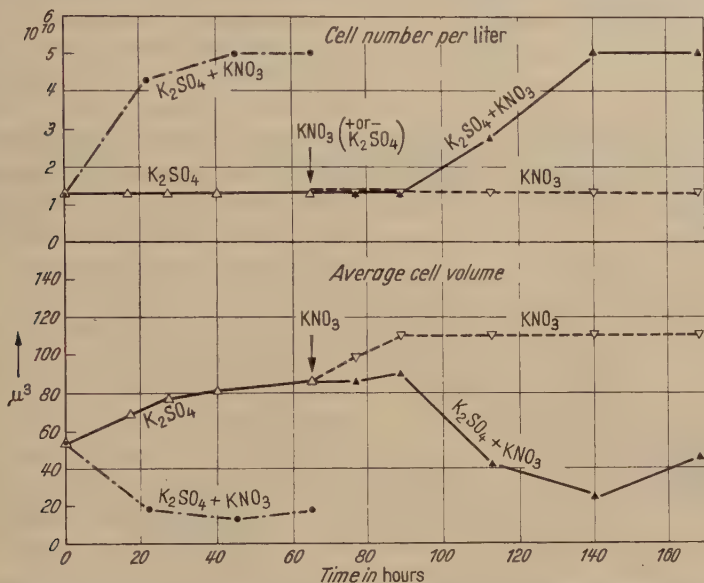


Fig. 4. Restoration of cell-dividing capacity of S-deficient cells by subsequent provision of sulfate and nitrate only (under photosynthesizing conditions). Starting material used was S-deficient cells, which were successively resuspended in media containing sulfate plus nitrate or sulfate alone or nitrate alone as indicated. See text for full explanation

during the period of incubation¹. By microscopic observation it was found that the cells grown under such a condition contained, on an average, four Feulgen-stainable particles and four differentiated chloroplasts.

3. Restoration of cell-dividing capacity of S-deficient cells by subsequent provision of sulfate and nitrate only (under photosynthesizing condition)

Interesting phenomena were observed when the S-deficient cells, which had been grown up (under photosynthesizing conditions) till they attained a steady stage, were supplied², either (i) with sulfate alone, or (ii) with sulfate plus nitrate, and further kept under photosynthesizing conditions (see Fig. 4). The cells supplied with sulfate alone increased somewhat in

¹ Such cells remained incapable of cell division even when they were transferred to non-photosynthesizing conditions (in the presence of sulfate only).

² After the cells were washed three times with distilled water.

mass, without, however, being able to perform cellular division. On the other hand, the cells supplied with sulfate plus nitrate divided immediately with the multiplication

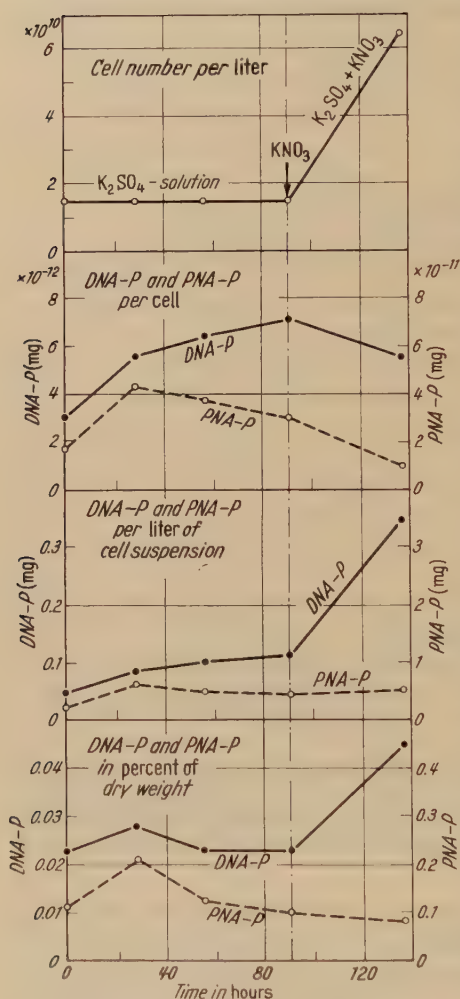


Fig. 5. Changes in nucleic acids contents of S-deficient cells incubated first in a medium containing sulfate only and later in a medium containing sulfate and nitrate (under photosynthesizing conditions). For details see text

number of 4. At the 65th hour of the experiment, the cells treated as (i) were washed three times with distilled water and then resuspended partly in a solution containing nitrate only, and partly in a solution containing sulfate and nitrate. When they were kept further under photosynthesizing conditions, the cells which had been resuspended in a solution containing nitrate only increased in mass to some extent, but remained unable to perform cellular division, while the cells which had been resuspended in the solution containing sulfate and nitrate could perform, after about 24 hours of induction period, cell division with the multiplication number of about 4.

With the experimental arrangements similar to those mentioned above, the contents of cells in DNA and PNA were followed (see Fig. 5). When the S-deficient cells were supplied with sulfate alone (under photosynthesizing conditions) both DNA and PNA increased during the initial 30 hours. Thereafter, however, the formation of DNA gradually slowed down to attain a level (per cell) that was approximately four times as high as that of the starting "dark cells".

During the same period, there occurred a gradual decrease of PNA which had been accumulated during the initial 30-hour period of experiment. When, at the 90th hour of incubation, potassium nitrate was supplied to the medium, cellular

division took place, and in the meantime, a considerable amount of DNA was formed, whereas the quantity of PNA remained practically unaltered. These results indicate clearly that the assimilation of sulfur and nitrogen was essential for the synthesis of DNA, and that for the formation of PNA some element(s) other than sulfate and nitrate was also required under the experimental conditions used. When the cell division was completed, the DNA content per cell was found to be about 3.5 times that of the starting "dark cells".

Discussion

The data obtained under various experimental conditions are reproduced schematically in Fig. 6, in which also the corresponding data obtained for the normal life cycle of algal cells are presented for comparison.

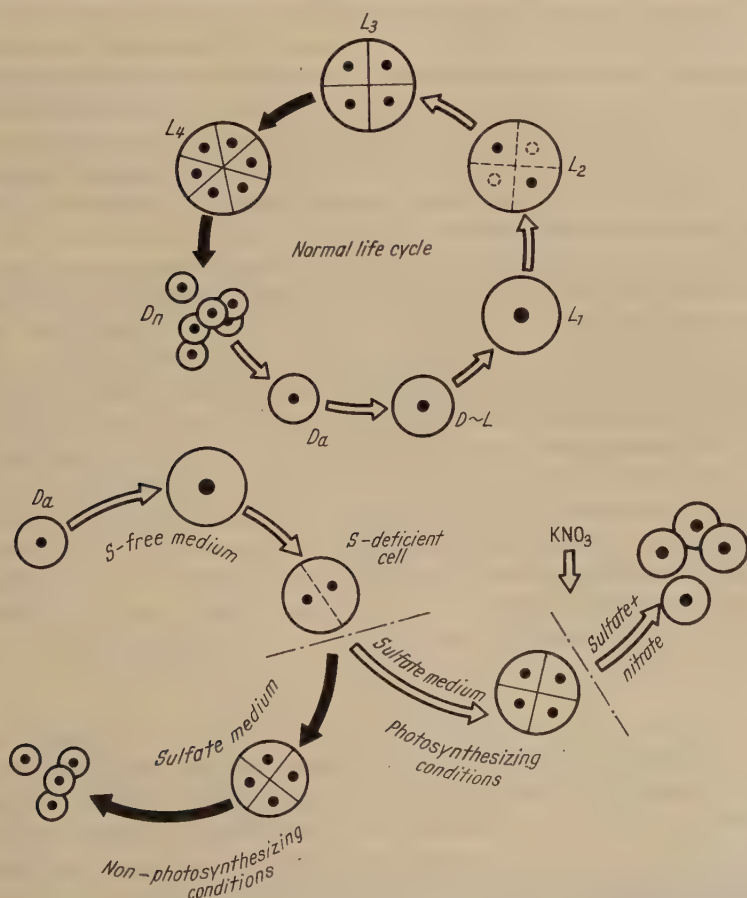


Fig. 6. Schematic representation of the life cycle of *Chlorella*, showing the changes in cell size, number of nucleus, and the content of DNA, occurring under various environmental conditions. See text for full explanation

In this figure, the successive developmental stages of cells and their relative sizes are shown by (open) circles; the white and black arrows indicate, respectively, the processes occurring under photosynthesizing and non-photosynthesizing conditions. The solid circles represent nuclei, their number in each circle representing the average number of FEULGEN stained particles observed in each cell, and their sizes and numbers showing the relative quantities of DNA determined by chemical analysis. For the definitions and characteristics of successive developmental stages (D_n , D_a , $D \sim L$, L_1 , L_2 , L_3 and L_4), and the changes of DNA content of cells occurring in the normal life cycle, reference is made to our previous reports (HASE et al. 1957, IWAMURA et al. 1955). The broken lines drawn in the figure indicate that the cell development did not proceed further under respective conditions.

It was clearly demonstrated that the process of cell division of *Chlorella* could be in various ways modified by the control of supply of sulfur and nitrogen sources as well as by the control of photosynthetic process. It is notable that the cells, which had been made S-deficient and later supplied with sulfate only, were capable of cell division under non-photosynthesizing conditions, but not under photosynthesizing conditions. Under non-photosynthesizing conditions, some nitrogenous substance(s) which existed in the S-deficient cells might have been effectively used for the process of cellular division, while under photosynthesizing conditions, the nitrogenous substance in question might have been used up by some reaction related to photosynthesis, so that it became inaccessible to the process of cellular division. To make the cells at such a stage capable of cellular division, simultaneous provision of sulfate and nitrate was necessary. It is remarkable that the daughter cells produced under such a condition contained a larger amount of DNA per cell than the original D_a -cells¹. At any rate, it may be concluded that sulfur plays, in cooperation with some nitrogenous substance(s), an essential role in the process of DNA-formation and nuclear division as well as in the process of cellular division. Further experiments are in progress to make clear the biochemical mechanism involved in this interesting role played by sulfur.

Summary

1. The role of sulfur in the process of cell division of *Chlorella* was studied using the technique of synchronous culture. When the "dark cells" (smaller and strongly photosynthesizing cells), which had been grown in a normal nutrient medium, were further cultured in an S-deficient medium under photosynthesizing conditions, the cells grew up to some

¹ In Fig. 6 these daughter cells are tentatively represented as mononucleate cells having larger DNA-content than the original D_a -cells; however, it is not yet certain whether these cells are actually mononucleate or not.

extent, showing about two-fold increase of DNA-content followed by the division of nucleus into two. At this stage, however, the cells fell into a stalemate, being unable to complete *cellular* division.

2. When such cells were transferred to a medium containing potassium sulfate only, some synthesis of DNA and further division of nuclei occurred. Under non-photosynthesizing conditions, the process of cellular division ensued, giving rise to a formation of small daughter cells. Under photosynthesizing conditions, on the other hand, the cells increased appreciably in size, without, however, being able to perform cellular division. The process of cellular division thus halted could be resumed when the cells were further supplied with nitrate and sulfate under photosynthesizing condition.

3. Based on these observations, it was concluded that sulfur plays, in cooperation with some nitrogenous substance(s), an essential role in the process of DNA-formation and nuclear division as well as in the process of *cellular* division.

This work was supported by grants from the Ministry of Education and the Rockefeller Foundation. To these bodies we extend our grateful thanks.

References

- ARNON, D. I.: Micro-elements in culture solution experiments with higher plants. *Amer. J. Bot.* **25**, 322 (1938). — HASE, E., Y. MORIMURA and H. TAMIYA: Some data on the growth physiology of *Chlorella* studied by the technique of synchronous culture. *Arch. Biochem.* **69**, 149 (1957). — IWAMURA, T., E. HASE, Y. MORIMURA and H. TAMIYA: Life cycle of the green alga *Chlorella* with special reference to the protein and nucleic acids contents of cells in successive formative stages. *Ann. Acad. Sci. Fenn. A, II* (A. I. Virtanen Homage Volume), **60**, 89 (1955). — TAMIYA, H., T. IWAMURA, K. SHIBATA, E. HASE and T. NIHEI: Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella*. *Biochim. biophys. Acta* **12**, 23 (1953).

(Aus dem Institut für Tierphysiologie und Tierernährung und dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Ein Beitrag zur mikrobiologischen Methode der Vitamin B₆-Bestimmung speziell im Pansen *

Von

RUTH HELWIG

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 28. Mai 1958)

Zur Bestimmung von Vitamin B₆ in biologischen Flüssigkeiten wurde schon früher eine ganze Reihe von Testorganismen (vgl. z. B. RABINOWITZ 1947 und LICHSTEIN 1956) herangezogen. Es ist bekannt, daß im allgemeinen *Lactobacillen* hauptsächlich auf Pyridoxal und *Streptococcus faecalis* auf Pyridoxamin ansprechen. *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 dagegen reagiert auf den gesamten B₆-Komplex (E. G. SNELL u. a. 1945). Zu Bestimmungen des Gesamtgehaltes eines Mediums an B₆ ist darum der letztere am besten geeignet. Die verhältnismäßig einfache Kultivierung der Hefe und ihre Auswertung im Test läßt gut reproduzierbare Serienuntersuchungen zu. Im folgenden soll eine Methode beschrieben werden, die bei möglichst geringem Arbeitsaufwand vergleichende Untersuchungen über die Vitaminsynthese des Pansens zuläßt.

Methodik

Als Testorganismus wurde ein Stamm von *Saccharomyces carlsb.* 4228¹ benutzt. Als Stammnährboden diente Kartoffel-Glucose-Agar, auf den er monatlich überimpft wird: 300 g kleingeschnittene Kartoffeln wurden in 500 ml aqua. dest. weichgekocht, filtriert und wieder auf 500 ml aufgefüllt. 20 g Glucose wurden in 500 ml aqua. dest. gelöst. Beide Lösungen wurden getrennt bei maximal 1,2 Atü sterilisiert und dann erst zu 1000 ml vereinigt (pH 5—6). Nach Zufügen von 2% Agar wurde der Nährboden nur noch im strömenden Dampf 1/2 Std sterilisiert.

Für den eigentlichen Test wurden folgende Stammlösungen angesetzt (in Anlehnung an HOPKINS u. Mitarb. 1947 sowie ATKIN u. Mitarb. 1943): A: 1,5 g (NH₄)₂SO₄; 0,5 g CaCl₂; 1,0 g MgSO₄; 0,5 g NaCl; 50,0 g Glucose; 0,002 g H₃BO₃; 0,002 g ZnSO₄; 0,002 g MnSO₄; 0,005 g FeCl₃; auf 500 ml aqua bidest. auffüllen; pH 6,2. — B: 1,0 g KH₂PO₄; 0,5 g K₂HPO₄; auf 100 ml auffüllen. — C: Vitamin-Standard-Lösungen: Aneurin 1,0 mg; Inosit 100,0 mg; Biotin 0,8 mg; Ca-Pantothemat 20,0 mg; Pyridoxin 1,0 mg jeweils auf 100 ml aqua dest. (Pyridoxin zum Gebrauch: 1:1000 verdünnt = 10 mγ/ml).

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. AUGUST RIPPEL-BALDES zum 70. Geburtstag gewidmet.

¹ Der Stamm wurde freundlicherweise von der Universitäts-Kinderklinik zur Verfügung gestellt.

Jeweils 24 Std vor Beginn eines Testes wurde die Hefe in reiner Mineral-Nährlösung ohne Vitaminzusatz vorkultiviert, um sie von ihren eigenen Vitaminreserven zu befreien und für den Test empfindlicher zu machen. Dazu wurden vor der Beimpfung 10 ml Lösung A + 8 ml aqua bidest. sterilisiert und nach dem Erkalten 2 ml des getrennt sterilisierten Phosphatpuffers zugesetzt. Mit dieser Vorkultur wurden die Kulturen der Testreihe mit je 1 Tropfen aus einer 1 ml-Meßpipette beimpft. Zum Vergleich hierzu wurden Hefezellen einmal direkt vom Agar in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, zum anderen dreimal auf der Zentrifuge mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Von den so vorbehandelten Suspensionen wurden ebenfalls die Kulturen der Testreihe mit je 1 Tropfen beimpft.

Die Testmedien setzten sich wie folgt zusammen: 10 ml Lösung A; 1 ml Aneurinlösung; 1 ml Inositolösung; 1 ml Biotinlösung; 0,5 ml Ca-Pantothenatlösung; x ml Pyridoxinlösung; (4,5—x) ml aqua bidest. Insgesamt 18 ml Lösung wurden $\frac{1}{2}$ Std im strömenden Dampf sterilisiert. Nach dem Erkalten wurden 2 ml Lösung B steril zugesetzt.

Zur Eichreihe wurden folgende Konzentrationen gewählt:

0 mγ =	0,0 ml Pyridoxinlösung + 4,5 ml aqua bidest
5 mγ =	0,5 ml Pyridoxinlösung + 4,0 ml aqua bidest
10 mγ =	1,0 ml Pyridoxinlösung + 3,5 ml aqua bidest
15 mγ =	1,5 ml Pyridoxinlösung + 3,0 ml aqua bidest
20 mγ =	2,0 ml Pyridoxinlösung + 2,5 ml aqua bidest
30 mγ =	3,0 ml Pyridoxinlösung + 1,5 ml aqua bidest
40 mγ =	4,0 ml Pyridoxinlösung + 0,5 ml aqua bidest.

Von den säurehydrolysierten Proben wurde je 1 (bzw. 3) ml den Testkolben zugesetzt. Das Endvolumen der Testlösungen betrug in jedem Falle 20 ml. Die Kulturen wurden in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Kapsenbergkappen-Verschluß 24 Std bei 27° C geschüttelt und ihr Wachstum an Hand von Trübungsmessungen bestimmt.

Die zum Teil widersprechenden Angaben der Literatur zur Methodik des Vitamin B₆-Aufschlusses gaben Anlaß zu Untersuchungen über die optimale Behandlungsdauer mit optimalen Säurekonzentrationen.

Drei verschiedene Materialien wurden zu diesen Untersuchungen herangezogen: 1. 5 ml Pansen (zur Abscheidung der Futterreste durch Watte filtriert). 2. Pansenbakterien (aus 5 ml Pansen, auf der Zentrifuge gewaschen). 3. 1 g lufttrockenes Heu. Der Pansen wurde unmittelbar nach dem Aushebern aus dem Pansen verarbeitet. Diese Proben wurden mit folgenden Säurekonzentrationen aufgeschlossen: a) 25 ml 2 n H₂SO₄, b) 175 ml 0,055 n H₂SO₄, c) 25 ml 2 n HCl, d) 175 ml 0,055 n HCl. Um die optimale Aufschlußdauer zu ermitteln, wurden die obengenannten Proben je 1 Std, 3 Std und 5 Std lang bei 120° C im Autoklaven belassen. Nach dem Abkühlen wurden sie mit 2 n NaOH auf pH = 5 neutralisiert, filtriert und $\frac{1}{2}$ Std im strömenden Dampf sterilisiert. Die mit 2 n Säure aufgeschlossenen Proben wurden mit aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

Ergebnisse

Die Abb. 1 zeigt in a und b die Eichkurven nach verschiedener Vorbehandlung. Es ist offensichtlich, daß eine 24stündige Vorkultur in reiner Minerallösung ohne Vitaminzusatz die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den verschiedenen B₆-Konzentrationen erheblich steigert.

Ein direktes Einbringen der Zellen vom Kartoffel-Agar in die Testlösung führt, wie die Kurve zeigt, zu ziemlich großen Streuungen. Das Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung hat im Vergleich hierzu

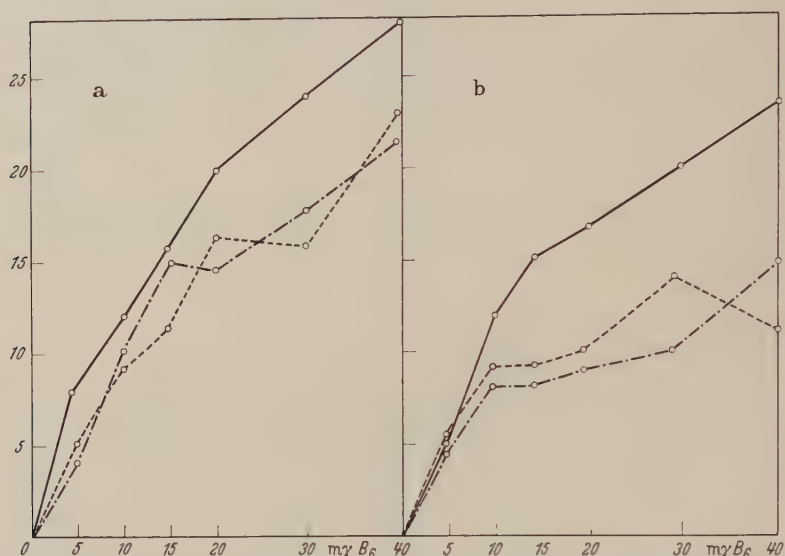


Abb. 1. Eichkurven zum Vitamin B_{12} -Test mit *Saccharomyces carlsbergensis* 4228. a mit 24 Std alter Stammkultur; b mit 3 Tage alter Stammkultur. $\circ$ — $\circ$ nach 24stündiger Vorkultur; $\circ$ — — $\circ$ nach dreimaligem Waschen; $\circ$ — · — $\circ$ unmittelbar von Kartoffelagar in physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt

Tabelle 1.

Aufschlußtest verschiedener Materialien mit verschiedenen Säurekonzentrationen

		2 n H_2SO_4			0,055 n H_2SO_4			2 n HCl			0,055 n HCl		
		P	B	H	P	B	H	P	B	H	P	B	H
I	1	260	90	8600	198	54	4320	150	90	7200	180	54	3200
	3	660	140	10200	324	216	5760	310	140	8600	253	162	7000
	5	220	—	9400	162	—	9000	260	60	8600	54	—	6300
II	1	287	60	4330	216	186	4660	313	187	6000	240	120	5800
	3	573	117	6330	288	228	6660	480	140	7160	264	150	8000
	5	480	87	6000	288	120	10500	573	133	1200	282	90	2100

I = 1 ml Aufschlußlösung; II = 3 ml Aufschlußlösung. P = Pansensaft; B = Pansenbakterien; H = Heu.

praktisch keine Wirkung. Abb. 1 b zeigt die gleichen Kurven, jedoch von einer 2 Tage älteren Agar-Stammkultur. Die Tendenz ist die gleiche, nur zeigen die Kurven der Abb. 1 b insgesamt eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Vitamin B_{12} .

Bei der Bestimmung der Aufschlußproben auf ihren B₆-Gehalt wurden zur Kontrolle außer 1 ml auch 3 ml Testlösung je Kultur zugesetzt, um eine mögliche Hemmung des Testorganismus durch Substanzen des Aufschlußmediums festzustellen.

Die Zahlen in Tab. 1 geben den Vitamin B₆-Gehalt in $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pansensaft bzw. $\mu\text{g}/\text{g}$ Heu an. Die Ergebnisse des 2. Abschnittes (II) der Tabelle können mit denen des 1. Abschnittes (I) nicht verglichen werden, da bei II fast alle Kulturlösungen um 1 : 4 verdünnt werden mußten, um in den Meßbereich der Eichkurve zu gelangen. Der Heuaufschluß mußte in jedem Falle verdünnt werden und zwar bei I um 1 : 4 und bei II sogar um 1 : 10. An Hand von Tab. 1 kann jedoch festgestellt werden, daß offensichtlich eine 3stündige Hydrolyse mit 2 n H₂SO₄ bei 120° C für alle Proben die geeignete ist.

Der Heuaufschluß wurde noch einmal wiederholt und zwar mit sämtlichen Säurekonzentrationen 3 Std lang bei 120° C. Bevor die aufgearbeitete Testlösung der Hefenährlösung zugesetzt wurde, wurde sie um 1 : 5 verdünnt, um in jedem Falle in den Meßbereich der Eichkurve zu kommen. Die in Tab. 2 angegebenen Werte stimmen weitgehend mit denen der Tab. 1 überein.

Diskussion

Saccharomyces carlsb. 4228 scheint, wenn sie ständig auf Würzeagar gehalten wird, auf lange Sicht ihre Pyridoxinbedürftigkeit zu verlieren. Nach unseren Erfahrungen empfiehlt es sich jedenfalls, den Stamm ständig auf Kartoffel-Agar zu kultivieren, da dann die Empfindlichkeit ihrer Reaktion auf B₆ erhalten bleibt. Eine Parallelkultur vom gleichen Stamm, die auf Würze gehalten worden war, hatte diese Fähigkeit praktisch verloren. Weiterhin hat sich gezeigt, wie notwendig eine Entspeicherung der Hefezellen von ihren Vitaminreserven ist. Es reicht nicht aus, die Zellen nur durch einfaches Waschen für den Test vorzubereiten, da in diesem Falle nur möglicherweise aus dem Nähragar noch anhaftende Vitaminmengen beseitigt werden können, nicht aber die im Innern der Zellen festliegenden (und wahrscheinlich chemisch gebundenen) Reserven. Diese Reserven anzugreifen und die Zellen weitgehend zu „entspeichern“, war der Sinn der durchgeführten Vorkultur. Daß eine Verarmung an Vitaminreserven tatsächlich eintritt, belegt die Tatsache, daß eine weitere Passage in reiner Mineral-Nährlösung kein Wachstum mehr ermöglicht. Die Kontrolle zeigte praktisch nach 24 Std keine Trübung mehr.

Tabelle 2. Heuaufschlußtest

		1 ml	3 ml
I	2 n H ₂ SO ₄	9000	10000
	0,055 n H ₂ SO ₄	3060	4375
II	2 n HCl	8000	10000
	0,055 n HCl	2625	3280

Die Prüfung der B₆-Ausbeute bei verschiedenen Säurekonzentrationen und Hydrolysezeiten ergab, daß für die Bakterien allein wahrscheinlich auch eine niedrige Konzentration ausgereicht hätte. Im Interesse eines Vergleichs der Werte ist es jedoch ratsam, bei gleichen Bedingungen zu arbeiten. Außerdem scheint es so zu sein, daß die SO₄-Ionen von der Hefe im allgemeinen besser vertragen werden als die Cl-Ionen. Für die Höhe der Vitaminausbeute ist nicht allein die Aufschlußmethode als solche entscheidend, sondern auch die Verträglichkeit der Aufschlußlösung für den angewandten Testorganismus. Die in den vorliegenden Untersuchungen erzielten Ergebnisse sind daher nur unter den angegebenen Bedingungen und mit dem benutzten Teststamm gültig. Weitere Untersuchungen sollen Aufschluß über die Verteilung von Vitamin B₆ im Pansen unter verschiedenen Ernährungsbedingungen geben.

Zusammenfassung

Eine Vorbehandlung des Testorganismus zeigte, daß durch eine 24stündige Vorkultur in reiner Mineral-Glucose-Lösung die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit auf steigende Pyridoxinkonzentrationen im Gegensatz zu sofortigem Abimpfen der Zellen vom Agar gesteigert wird. Einfaches Waschen der Zellen hatte im Vergleich zu den Kulturen, deren Zellen nicht vorher gewaschen wurden, keine Wirkung.

Die Prüfung verschiedener Aufschlußzeiten mit verschiedenen Säurekonzentrationen zeigte, daß eine 3stündige Hydrolyse bei 120° C mit 2 n H₂SO₄ die beste Ausbeute bei Heu- und Pansensaftaufschluß brachte. In diesem Zusammenhang wird die Verträglichkeit von Aufschlußlösungen für den Testorganismus diskutiert.

Literatur

ATKIN, L., A. S., SCHULTZ, W. L. WILLIAMS, u. C. N. FREY.: Ind. Engng. Chem., analyt. edit. **15**, 141 (1943). — HOPKINS, R. H., u. R. J. PENNINGTON: Biochem. J. **41**, 110 (1947). — LICHTSTEIN, H. C.: J. biol. Chem. **219**, 27 (1956). — RABINOWITZ, J. C.: Analyt. Chem. **19**, 277 (1947). — SNELL, E. G., u. A. N. RANNEFELD: J. biol. Chem. **157**, 475, 491 (1945).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Agrarwissenschaftlichen Universität
Gödöllő, Ungarn)

Dauernde Heterocaryose bei einer *Streptomyces*-Art mit verlorener Sporulationsfähigkeit*

Von
J. HORVÁTH

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 24. April 1958)

Laut Literaturangaben bleiben bei den *Streptomyces*-Arten beschriebene Heterocaryosen bis zur Sporenbildung erhalten und segregieren danach entsprechend den parental Eigenschaften (BRADLEY u. LEDERBERG 1956; SZYBALSKI u. BRAENDLE 1956; BRAENDLE u. SZYBALSKI 1957; BRADLEY 1957; SZYBALSKI 1957). In unserer *Streptomyces*-Sammlung haben viele Arten die Eigenschaft, reichlich Luftmycelien zu bilden aber nicht zur Sporenbildung zu kommen. Diese Arten haben seit ihrer Einsammlung, d. h. in 7—8 Jahren, das ursprüngliche antibiotische Wirkungsspektrum verloren. Von diesen haben wir eine ausgewählt und vom Gesichtspunkt der Heterocaryose aus zur Untersuchung herangezogen.

Material und Methode

Die zur Heterocaryose-Untersuchung ausgewählte Art haben wir 1950 aus einem Wiesenmoorboden beim Plattensee isoliert (siehe HORVÁTH, SZOLNOKI, FELFÖLDY 1951) und mit der Bezeichnung 5/a publiziert. Laut neueren Untersuchungen ist sie identisch mit *Streptomyces fasciculus* Krasilnikow (WAKSMAN, LECHEVALIER 1953). Charakteristisch für sie ist, daß sie auf zahlreichen Nährböden Luftmycelien, aber auf keinem Nährboden Sporen bildet. Nach der Isolierung wurde sie weitergezüchtet; anfangs war sie antibiotisch ziemlich aktiv, später war ihre Wirkung minimal oder sie übte gar keinen Einfluß mehr auf *Staphylococcus aureus* und auf *Escherichia coli* aus. Um ihre früheren Eigenschaften zurückzugewinnen, haben wir sie u. a. Ultraviolettbestrahlung ausgesetzt (Hanauer Höhensonne Typ S. 300, Entfernung 35 cm, bis zur Letalität von 99,5%).

Dabei entstanden zu etwa 0,5 % „Mutanten“, deren Morphologie von der Ausgangsart stark abwich. Wegen des hohen Prozentsatzes dieser „Mutanten“ dachten wir gleich daran, daß wir es nicht mit Mutationen, sondern mit Heterocaryose zu tun hätten.

Diese Annahme haben wir mit der folgenden Methode bestätigt: Von einer Schrägagar-Oberfläche wurden die Luftmycelien abgekratzt und in einem größeren Reagensglas zwischen Glasperlen suspendiert und hier durch Schütteln während 30 min zwischen den Glasperlen zerrieben.

* Herrn Professor Dr. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

Die Lufthyphen-Fragmente waren im Mikroskop in ihrem Querschnitt und ihrer Länge beinahe gleich. Sie wurden auf Agar in Petrischalen ausgebreitet. So wurden aus den Fragmenten 300—350 Kolonien gewonnen,

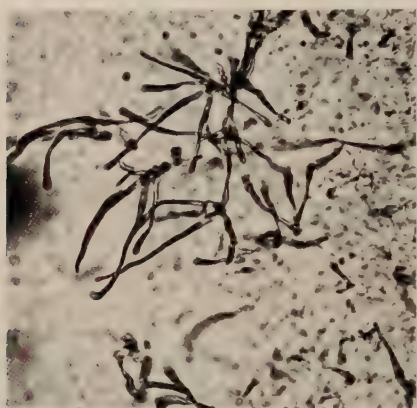


Abb. 1. *Streptomyces fasciculus*, nicht sporenbildende, gradlinig stehende Luftmycelien. 280fache Vergrößerung, von lebendem Material

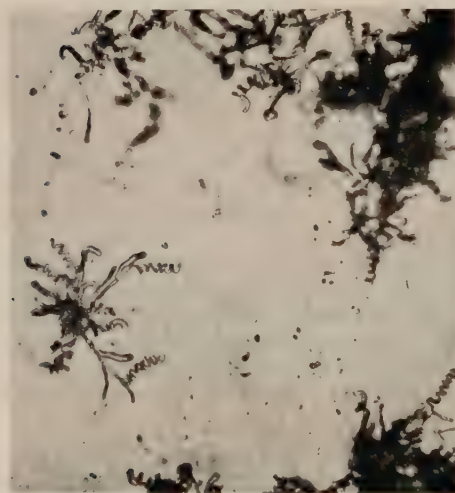


Abb. 2. *Streptomyces fimbriatus*, spiralförmige Luftmycelien, 280fache Vergrößerung, von lebendem Material

nach Bildung der Luftmycelien mit der Lupe untersucht und von den von der ursprünglichen Form abweichenden diejenigen isoliert, deren Morphologie der der durch Ultraviolettbestrahlung gewonnenen Kolonien vollkommen gleich war. Wir haben auch Kolonien isoliert, die die Gestalt der ursprünglichen Form aufwiesen; von ihnen haben wir dann ebenfalls die Luftmycelien in der oben beschriebenen Weise zerrieben und auf Agarplatten ausgebreitet, und daraus wieder die abweichenden Formen isoliert.

Untersuchungsergebnisse

In Abb. 1 zeigen wir Luftmycelien der mit *Streptomyces fasciculus* identischen Originalart, welche Luftmycelien, aber niemals Sporen bildet. Abb. 2 zeigt spiralförmige Lufthyphen, welche durch Ultraviolett-Bestrahlung zu 0,5%, durch Zerreiben von Lufthyphen zwischen Glasperlen zu 3% gewonnen wurden.

Abb. 3 zeigt in den spiralförmig gewundenen Hyphen entstandene Sporen. In den morphologischen Merkmalen weicht die Variation von den

Fragmenten, welche durch Zerreiben mit Glasperlen entstanden sind, vom Originalstamm dadurch ab, daß die Lufthyphen eine viel dunklere Färbung aufwiesen. Im übrigen ist diese Variante in vielen Eigenschaften mit *Streptomyces fimbriatus* identisch. Die durch Ultraviolettbestrahlung

entstandenen Stämme produzieren auf Kartoffel-Agar rote Farbe. Ihre Lufthyphen sind anfangs weiß, später weisen sie verschiedene graue Schattierungen auf. In ihren Fermentationsfähigkeiten weichen sie von *Streptomyces fasciculus* nicht wesentlich ab.

Sehr interessant ist dagegen die Veränderung der antibiotischen Spektren, wie die Tabelle zeigt. Das Ergebnis hatten wir auf Agarplatten durch Kreuzstrichtest gewonnen; die Hemmzone ist in Millimetern angegeben. Die Ausgangsform *Streptomyces fasciculus* verfügt also über ein nur sehr beschränktes Spektrum, wozu allerdings zu bemerken ist, daß der Stamm, als er vor 8 Jahren isoliert wurde, eine größere Hemmung auf *Escherichia coli* ausübte. Die *Streptomyces fimbriatus* ähnliche Form hat ein wirksameres Spektrum, aber die durch Ultraviolettbestrahlung und durch Zerreiben mit Glasperlen gewonnenen Varianten zeigen unter

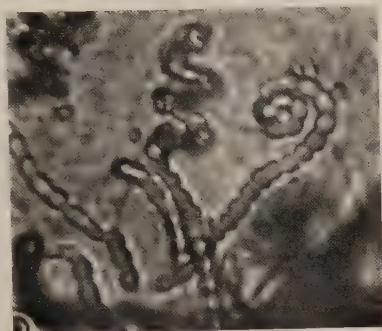


Abb. 3. *Streptomyces fimbriatus*. Sporen. 2000fache Vergrößerung, von lebendem Material

Tabelle

Testorganismus	Originalstamm von <i>Str. fasciculus</i>	<i>Str. fimbriatus</i> durch UV- Bestrahlung gewonnen	<i>Str. fimbriatus</i>	<i>Str. fasciculus</i>
			durch Zerreiben mit Glasperlen gewonnen	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	15,16	5,7
<i>Bacillus subtilis</i>	0	4	11,6	10
<i>Escherichia coli</i>	Spur	0	0	6,7
<i>Sarcina lutea</i>	12	7,10	20,26	15
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	0	7,8
<i>Bacillus radiobacter</i>	Spur	8	5	14,8
<i>Mycobact. peregr.</i>	6	10	15	5,6
<i>M. phlei</i>	2	7,15	10	3,2
<i>M. smegmatis</i>	14	7	8	3
<i>Nocardia rosea</i>	0	2	Spur	20
<i>Streptomyces griseus</i>	12	2	10	10
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0	0	0	Spur

sich Unterschiede. Die letzteren sind antibiotisch stärker wirksam. Beide stimmen aber darin überein, daß sie auf *Escherichia coli* keine Wirkung haben. Der aus Hyphenfragmenten entstandene *Streptomyces fasciculus*

hingegen hat ein breites Wirkungsspektrum und übt auf *Escherichia coli* eine bestimmte Wirkung aus. Hierin verhält er sich ähnlich wie der vor 8 Jahren isolierte und untersuchte Stamm.

Besprechung

Außer den besprochenen Beispielen zeigen auch aus anderen Böden isolierte Stämme die Eigenschaft, reichlich Lufthyphen, aber keine Sporen zu bilden. Die untersuchte Art stimmt im wesentlichen mit *Streptomyces fasciculus* überein und hat mit der spiralige Lufthyphen bildenden, mit *Streptomyces fimbriatus* übereinstimmenden Art Heterocaryose gebildet. Die gradlinigen Lufthyphen sind dominant, während die spiralförmigen Luftmycelien sich als rezessiv nicht offenbaren. Charakteristisch ist, daß der heterocaryotische *Streptomyces fasciculus* keine Sporen bilden kann. Es ist anzunehmen, daß auf Grund der durch die Zellfusion bewirkten Heterocaryose bei diesen genügend voneinander abweichenden Arten eine hemmende Wirkung auf die Sporenbildung hervorgerufen wird. Obwohl die ausgewählten Stämme von *Streptomyces fimbriatus* Sporen bilden können, kann dies der restliche *Streptomyces fasciculus* auch in diesem Falle nicht. Durch Zerreiben und Ultraviolett-Bestrahlung können Stämme bzw. Arten zustande kommen, welche unterschiedliche antibiotische Wirkungsspektren aufweisen.

Aus dieser Tatsache kann man folgern, daß die Ausgangsart nicht nur durch Paarung zweier Arten, sondern durch 3 oder 4 Arten-Paarung entstanden sein kann. Charakteristisch ist noch, daß durch sehr lange Haltung (8 Jahre) antibiotisch sehr schwach wirkende Stämme entstehen, aus deren Hyphenfragmenten wieder stärker antibiotisch wirksame Stämme erhalten werden können.

Zusammenfassung

1. Wir haben eine *Streptomyces fasciculus* ähnliche, nur Luftmycelien bildende Art einerseits Ultraviolett-Bestrahlung ausgesetzt, andererseits wurden die Luftmycelien zwischen Glasperlen zerrieben.

2. Mit Ultraviolett-Bestrahlung haben wir in 0,5%, durch Zerreiben in 3% eine morphologisch abweichende und mit spiralförmigen Luftmycelien versene *Streptomyces fimbriatus* ähnliche Art gewonnen.

3. Die nach dem Zerreiben zurückgebliebene Art bildete in 97% der Fälle auch weiter keine Sporen. Aus mit Glasperlen zerriebenen, einzelnen Lufthyphen-Fragmenten entstandene Kolonien zeigten, daß wir hier dauernder Heterocaryose gegenüberstehen.

4. Die Fähigkeit zur Bildung spiralförmigen Luftmycelien ist eine rezessive Eigenschaft, diejenige zur Bildung gerader Lufthyphen ist dominant.

5. Die Kolonien, welche nach Zerreiben von Luftmycel aus Hyphen-Fragmenten entstehen, zeigen sehr abweichende antibiotische Eigenschaften, woraus gefolgert werden kann, daß es sich hier um eine Heterocaryose aus 3 oder 4 Arten handelt.

Literatur

BRAENDLE, D. H., and W. SZYBALSKI: Bact. Proc. p. 52 (1957). — BRADLEY, S. G., and J. LEDERBERG: J. Bact. **72**, 219 (1956). — BRADLEY S. G.: J. Bact. **73**, 581 (1957). — HORVÁTH, J., J. SZOLNOKI u. L. FELFÖLDY: Annal. Biol. Tihany. **20**, 225 (1951). — SZYBALSKI, W., and D. H. BRAENDLE: Bact. Proc. p. 48 (1956). — SZYBALSKY, W.: Genetics of *Streptomyces fradiae*, from Neomycin. The Nature and Practical Application. Baltimore: S. A. WAKSMAN, Ed., Williams & Wilkins 1957. — WAKSMAN, S. A., and H. A. LECHEVALIER: Actinomyces and their antibiotics. Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1953.

(Aus dem Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie an der
Technischen Hochschule in Wien)

Über den Einfluß der Ernährung auf die Protein-Zusammensetzung von Essigbakterien*

Von

ALEXANDER JANKE und MAX RÖHR

(Eingegangen am 14. April 1958)

1. Die Zusammensetzung der Bakterien-Proteine in Abhängigkeit von Entwicklungszustand, Alter und Ernährung

Über die Zusammensetzung der Bakterien-Proteine im allgemeinen liegen schon zahlreiche Untersuchungen vor, über jene der Proteine von Essigbakterien hingegen nur zwei Analysen, nämlich jene von KANDLER u. ZEHENDER (1956) an *Acetobacter xylinum* sowie jene von REUSSER, SPENCER u. SALLANS (1957) an *Acetobacter suboxydans*. In den meisten Fällen fand die durch CONSDEN, GORDON u. MARTIN (1944) entwickelte Papierchromatographie Verwendung, wobei die relative Menge der Aminosäuren aus der Größe der Flecke und der Intensität der Färbung geschätzt wurde. Aber auch Verfahren der quantitativen Papierchromatographie wurden zur Bestimmung der Aminosäuren herangezogen. So benutzte POLSON (1948) die durch POLSON, MOSLEY u. WYCKHOFF (1947) entwickelte Methode und REUSSER, SPENCER u. SALLANS (1957) untersuchten die Aminosäuren gruppenweise mittels eindimensionaler Papierchromatographie unter Verwendung gepufferter Lösungsmittel. CAMIEN, SALLE u. DUNN (1945) sowie STOKES u. GUNNESS (1946) jedoch bedienten sich zur Aminosäure-Bestimmung mikrobiologischer Methoden.

In einer Reihe von Arbeiten wurde die Frage, inwieweit die Zusammensetzung der Bakterien-Proteine mit dem Entwicklungszustand der Organismen, dem Alter der Kultur sowie den Ernährungsbedingungen variiert, zu beantworten versucht. RIPPEL-BALDES, BUSCH u. RADLER (1956) unterwarfen die durch anderweitige Einflüsse als jene durch Antibiotica hervorgerufenen Abweichungsformen von Mikroben einer Analyse und konnten gegenüber den Normalzellen bei *Serratia marcescens* weder qualitativ noch quantitativ einen Unterschied feststellen, während bei anderen Mikroorganismen eine Zunahme der cyclischen Aminosäuren und der Glutaminsäure zu beobachten war.

Die am Aufbau der Bakterienproteine beteiligten Aminosäuren scheinen vom Alter der Kultur sowie von der Art der Ernährung unabhängig zu sein. Dies geht aus Untersuchungen von STOKES u. GUNNESS

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL-BALDES zum 70. Geburtstag gewidmet.

(1946) an verschiedenen Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen, von FREELAND u. GALE (1947) an *E. coli* und *Aerobacter aerogenes*, von BUKATSCH, BURGER u. SCHLÜTER (1956) an *Azotobacter*-Arten sowie aus jenen von RAO u. WADHWANI (1956) an *Mycobacterium tuberculosis* hervor.

In quantitativer Hinsicht aber sind die Ergebnisse nicht einheitlich. Während STOKES u. GUNNESS (1946) und vor allem RAO u. WADHWANI (1956) eine diesbezügliche Abhängigkeit von Alter und Ernährung feststellten, konnten KELNER u. MARTIN (1954) an *E. coli* keine mengenmäßigen Unterschiede an den einzelnen Aminosäuren erkennen, ob nun diese Bakterienart in hochwertiger Bouillon oder in einer synthetischen Nährlösung gewachsen war. Inwieweit diese gegenteiligen Feststellungen methodologisch bedingt sind, werden wohl künftige Überprüfungen zeigen.

Nach den zur Zeit vorliegenden Befunden ist die Zusammensetzung der Mikroben-Eiweiße für Zwecke der Taxonomie und Systematik kaum zu verwerten. Wohl aber scheint dies zufolge CUMMINS u. HARRIS (1956) für die stickstoffhaltigen Zellwand-Bestandteile zuzutreffen und zwar sollen die Gattungen durch den Anteil an Aminosäuren, die Arten aber durch jenen an Zucker und Aminozucker unterschieden sein. Auch diesbezüglich wären weitere Untersuchungen sehr erwünscht.

Es schien nun von Interesse, die Frage des Einflusses der Ernährung auf die Protein-Zusammensetzung und die Bedeutung der letzteren für Zwecke der Taxonomie und Systematik der Essigbakterien zu untersuchen, zumal bei diesen Mikroben innerhalb ein und desselben Genus *Acetobacter* grundsätzliche Unterschiede in der Ernährung vorkommen, wie sonst in kaum einer anderen Bakteriengattung; es handelt sich um die Unterscheidung zwischen *haplotrophen* und *symplophen* Essigbakterien.

2. Haplotrophie und Symplophie bei Essigbakterien

(vgl. JANKE 1916, 1957, 1958)

Die Essigbakterien, d. h. jene Bakterien, die Alkohol in saurer Lösung ($\text{pH} < 5$) zu Essigsäure dehydrieren, sind offenbar zu den C-heterotrophen Organismen zu rechnen. Wenn bei ihnen auch CO_2 -Aufnahme zu beobachten ist, wofür die Feststellungen von RASUMOWSKAJA u. BJELOUSOWA (1952) an Schnellessigbakterien und jene von GSUR (1953) mit radioaktivem $^{14}\text{CO}_2$ in submerser Anreicherungskultur von Essigbakterien sprechen, so spielt einerseits das so eingebaute CO_2 im Gesamtstoffwechsel wohl nur eine untergeordnete Rolle und andererseits werden für die Assimilation des CO_2 organische C-Verbindungen als Energiequelle benötigt.

Bereits HOYER (1898) hatte die Beobachtung gemacht, daß *A. aceti* (P.) Beij. auch dann imstande ist, seinen N-Bedarf aus Ammoniumsalzen zu bestreiten, wenn bloß Essigsäure als Energiequelle zur Verfügung steht. Diese Essigbakterien, die JANKE (1916) *haplotrophe* nannte, sind als die wirksamen beim sogenannten Schnellessig-Verfahren betrachtet worden, welche Ansicht jedoch in neuerer Zeit durch SHIMWELL (1954) anscheinend widerlegt wurde. Jene Essigbakterien aber, die eine komplexere

Nahrung benötigen, werden als *symplotrroph* bezeichnet. Während sich nun die haplotrophen Essigbakterien ernährungsphysiologisch ziemlich gleichartig verhalten, weichen die symplotrrophen in dieser Hinsicht untereinander stark ab.

Die Nährlösung von HOYER (1898), die außer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und verschiedenen anderen Mineralsalzen nur Essigsäure bzw. Acetate als C-Quelle enthielt, wurde durch FRATEUR (1950) insofern modifiziert, als ein Phosphatpuffergemisch Verwendung fand, wodurch Alkohol als C-Quelle genügte; außerdem erfolgte der Zusatz eines Eisensalzes. Die Zusammensetzung dieser auch von uns verwendeten Nährlösung ist die folgende:

0,90 g KH_2PO_4 , 0,10 g K_2HPO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ aq.}$, 0,005 g FeCl_3 , 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,0 Vol.-% Äthanol, in 1000 ml dest. Wasser; pH 6,3.

Als haplotrophe Essigbakterien benutzten wir *A. aceti* (P.) Beij., sowie *A. lovaniense*, den FRATEUR (1950) aus einer Erdprobe der Umgebung von Lovain (Löwen) in Belgien isoliert und näher beschrieben hat. Diese uns vom mikrobiologischen Institut der Technischen Hochschule in Delft freundlichst zur Verfügung gestellten Stämme konnten sowohl auf der Hoyerschen als auch auf der von FRATEUR modifizierten Lösung zur Entwicklung gebracht werden.

Ein Ersatz des Äthanol durch Acetate (0,1 g Na-Acetat/100 ml) hatte eine deutliche Stimulierung des Wachstums zur Folge, so daß es den Anschein hat, daß die Synthese der Zellsubstanz eigentlich über die Essigsäure läuft und Äthanol nur insoweit als C-Quelle genutzt wird, als es durch die mit der Einsaat eingebrachten Enzymsysteme eine Dehydrierung zu Essigsäure erfährt.

Als Vertreter der symplotrrophen Essigbakterien wurde *A. rancens* (Beij.) Stamm B 65 NRRL, den wir der Universität Birmingham verdanken, herangezogen. Dieser Organismus ließ sich nur auf einem Medium, das Glucose als C-Quelle und Hefeautolysat als N- und Wuchsstoffquelle enthielt, zur Vermehrung bringen, nicht hingegen auf einem Substrat, das außer den üblichen Wachstumsfaktoren eine Kombination von 21 reinen Aminosäuren aufwies. Es scheinen hier ähnliche Verhältnisse vorzuliegen wie bei RAO u. STOKES (1953a, b), die für den von ihnen verwendeten Stamm von *A. rancens* einen im Hefeautolysat enthaltenen, aber noch nicht bekannten Wuchsstoff als nötig erachten.

3. Eigene Untersuchungen über die Proteinzusammensetzung von *Acetobacter*-Arten

a) Gewinnung von Massenkulturen

Solche wurden in flüssigen Medien als Submers-Kultur am Exzenter-Kreis-schüttler bei 25° C gewonnen. Als Kulturgefäße dienten Erlenmeyerkolben, deren weiter Hals mittels Wattehauben (JANKE 1952) verschlossen war, die eine ausreichende Luftversorgung gestatten.

A. lovaniense kam in der oben angegebenen Nährlösung von FRATEUR (1950) zur Entwicklung. Vier große Erlenmeyerkolben zu 1000 ml mit je 100 ml Nährlösung wurden mit 5 Tage alten Submers-Kulturen beimpft und nach 10 Tage langem ununterbrochenem Schütteln abgeerntet, wobei 50 mg Trockensubstanz gewonnen werden konnten. *A. aceti* zeigte auf der gleichen Nährlösung ein ergiebigeres Wachstum als *A. lovaniense*, so daß er bei gleicher Kulturdauer ungefähr das doppelte Erntegewicht lieferte.

Um den Einfluß der Ernährung auf die Protein-Zusammensetzung der gleichen *Acetobacter*-Art zu studieren, wurde in der Frateurschen Lösung der Alkohol durch 2,5% Glucose und das Ammoniumsulfat durch Hefeautolysat ersetzt und zwar in

einer Menge, daß die so erhaltene Lösung den doppelten Gehalt an N-Äquivalenten aufwies. Die Einstellung des p_H -Wertes erfolgte auf jenen der Frateurschen Lösung (6, 3) mittels n-Natronlauge. Die eben erwähnte Nährlösung diente auch zur Massenkultur von *A. rancens*, wobei wir wieder 50 mg Trockensubstanz erhielten.

Die durch Zentrifugieren abgeschiedenen Bakterienzellen waren in allen Fällen durch Waschen mit dest. Wasser von den anhaftenden Nährstoffresten befreit und am Wasserbad getrocknet worden.

b) Herstellung des Hydrolysats

Die Hydrolyse der getrockneten Bakterienzellen erfolgte durch Erhitzen der Proben mit der 100fachen Menge 6 n-HCl bei 105° C im Einschlußrohr während 15 Std. Die hierbei gebildeten Huminsubstanzen wurden durch Abfiltrieren entfernt und die Salzsäure durch mehrmaliges Abdampfen im Vakuum der Wasserstrahlpumpe bei 75° C verjagt, wobei dest. Wasser zur Aufnahme des jeweiligen Rückstandes diente.

Von der schließlich erhaltenen Lösung des Rohhydrolysates in dest. Wasser fand eine geringe Menge zur unmittelbaren Analyse Verwendung, während aus dem Hauptteil die Salze und anderen störenden Verbindungen mittels des Kationenaustauschers Amberlite IR 120 entfernt wurden.

c) Papierchromatographische Analyse

Diese kam als Halbmikromethode zur Ausführung. Als unbewegliche Phase diente das Schl. & Sch.-Papier Nr. 2043 b Gl, das in quadratischen Blättern 21,5:21,5 cm zur Verwendung kam. Die Chromatographie wurde aufsteigend zweidimensional mit den Lösungsmittelpaaren n-Propanol + Wasser (70 + 30) und Phenol + Wasser (75 + 25) nach BOISSONAS (1950) ausgeführt.

Die Auftragung der wäßrig-alkoholischen Lösung des gereinigten Aminosäure-Gemisches auf das Chromatographiepapier erfolgte in einer Menge zu je 50—300 μ g. Bei einer Versuchstemperatur von 27,5° C betrug die durchschnittliche Laufzeit des Chromatogramms in einer Richtung 7—9 Std.

Zum Nachweis der Aminosäuren fand eine mit Essigsäure angesäuerte Lösung von 0,1% Ninhydrin in n-Butanol Verwendung, mit der die bei 80° C getrockneten Chromatogramme besprüht, dann durch 10 min auf 60° C erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert wurden. Zwecks Erhöhung der Haltbarkeit der Farbflecke erfolgte mitunter eine Umwandlung der Ninhydrin-Verbindungen in die roten Kupfer-Komplexe durch Besprühen mit einer salpetersäurehaltigen Lösung von Kupfernitrat in Methanol nach KAWERAU u. WIELAND (1951).

Nach dem Vorgang der meisten früheren Untersucher wurde die relative Menge der einzelnen Aminosäuren durch subjektiven Vergleich der Flecke nach Größe und Farbintensität geschätzt und das Ergebnis durch die Ziffern 1—5 ausgedrückt, wobei die Ziffer 5 der in höchster Konzentration auftretenden Aminosäure Alanin zugeordnet wurde. Diese Feststellungen erfolgten jeweils sofort nach Besprühen der Chromatogramme sowie 4 und 24 Std nachher. Von jeder verfügbaren Aminosäure lief ein Kontrolltest mit, um die R_f -Werte zu überprüfen.

Die geübte subjektive Beurteilung leidet an einer nicht genügenden Berücksichtigung der stark von einander abweichenden Erfassungsgrenzen der einzelnen Aminosäuren.

Durch die geschilderte Methode konnten Tyrosin, Tryptophan sowie Cystein und Cystin nicht erfaßt werden, da diese Aminosäuren bei der

Säurehydrolyse eine weitgehende Zerstörung erleiden. Wohl aber ließen sich Tyrosin und Tryptophan sowie S-haltige Aminosäuren im Rohprotein nachweisen.

Um Phenylalanin von Leucin-Isoleucin klar abzutrennen, kam ein Chromatogramm mit dem Lösungsmittelgemisch tert. Butanol + Methyl-

Tabelle 1. *Chromatographisch nachgewiesene Aminosäuren im Hefeautolysat und in den Hydrolysaten von Essigbakterien*

	Hefeautolysat	<i>A. rancens</i> in Glucose- Hefeautolysat	<i>A. lovaniense</i> in Frateur-Lösung	<i>A. aceti</i> in Frateur-Lösung
Alanin	5	5	5	5
Asparaginsäure	4	4	4	3—4
Glutaminsäure	4	5	5	4—5
Glycin	3	4—5	4—5	4
Valin	3	3—4	4	4
Leucin/Isoleucin	3	4	4—5	4—5
Serin	2	4	3—4	4
Threonin	2—3	3—4	3—4	3—4
Lysin	2—3	2	2	3—4
Phenylalanin	1	1—2	2—3	2—3
Prolin	2	2	2	1—2
Arginin	2	2	2	2
Methionin		1—2	1—2	1
Histidin	1	1	1	1—2
Oxyprolin	2	(1)	(1)	(1)
γ -Aminobuttersäure	3—4	(1)	—	—
α -Aminobuttersäure	—	(1)—1	1—2	1—2
Fragliche Verbind. X		(1)	(1)	(1)
Tyrosin	}	qualitativ im Bakterienprotein nachgewiesen		
Tryptophan				

Die Ziffern geben die durch Schätzung ermittelte Größe und Farbintensität der Flecke an; das gerade noch erkennbare Vorkommen eines Fleckes findet sich mit (1) bezeichnet.

Die in der Tabelle angeführten Werte sind Mittelwerte aus einer größeren Zahl von Chromatogrammen.

äthylketon + Wasser + Ameisensäure (80 + 80 + 19,5 + 0,5) (BOISSONAS 1950) zur Ausführung, wobei nach 5maligem Lauf eine zufriedenstellende Abtrennung des Phenylalanins und auch ein günstiger Trenneffekt bei Leucin-Isoleucin erzielt wurde.

d) Ergebnisse der chromatographischen Analyse (vgl. Tab. 1)

I. Bezüglich der Zusammensetzung der Proteine des wuchsstoffheterotrophen *A. rancens*, der auf einem Glucose-Hefeautolysat-Medium gewachsen war, läßt sich folgendes aussagen:

a) Die chromatographische Analyse der über Amberlite IR 120 gereinigten Hydrolysate ergab deutliche, gut begrenzte Flecke der

folgenden Aminosäuren, die sich auf Grund einer Schätzung mengenmäßig in 3 Gruppen zusammenfassen lassen; es finden sich vor

1. in relativ bedeutender Menge: Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Serin, Threonin, Leucin-Isoleucin sowie Valin;

2. in mäßiger Menge: Lysin, Arginin, Prolin, Methionin und Phenylalanin.

3. in geringer Menge: Histidin, Oxyprolin, α -Aminobuttersäure und eine unbekannte Verbindung X, die möglicherweise mit der durch WORK (1950) aufgefundenen α , ε -Diaminopimelinsäure, die zufolge WORK u. DEWEY (1953) unter den Bakterien eine weite Verbreitung aufweist, identisch ist.

Tryptophan und Tyrosin konnten im Protein selbst nachgewiesen werden.

Etwa 48 Std nach Fertigstellung des Chromatogrammes zeigte sich noch ein kleiner Fleck etwas oberhalb von jenem der Asparaginsäure.

b) Bei den *Roh-Hydrolysaten* zeigten die Flecke einzelner Aminosäuren eine undeutliche Abgrenzung und zum Teil auch Verzerrungen. Besonders stark traten solche beim Fleck der Asparaginsäure in Erscheinung und jener der Glutaminsäure war überhaupt schwer zu erkennen. Dafür fanden sich oberhalb der Orte der beiden genannten Aminosäuren zwei Flecke von ziemlich starker Intensität sowie mit Schwanzbildung in Richtung des aufwärtssteigenden Propanols vor. Es war mit der Möglichkeit zu rechnen, daß ein sog. „Trägereffekt“ durch Neutralsalze vorliegt, die die Aminosäuren — zufolge TURBA (1954) vor allem Asparaginsäure und Glutaminsäure — vor sich herschieben, wodurch höhere R_f -Werte vorgetäuscht werden.

II. Die Untersuchung der Proteine des haplotrophen *A. lovaniense* ergab folgendes:

a) Das Protein-Hydrolysat des auf Frateur-Lösung gewachsenen *A. lovaniense* bestand aus den gleichen Aminosäuren und im wesentlichen auch aus der gleichen mengenmäßigen Gruppierung derselben wie jenes von *A. rancens*; nur war der Schätzung nach etwas mehr Valin, Leucin-Isoleucin sowie Phenylalanin, jedoch etwas weniger Serin zugegen. In der Gruppe III konnte wieder die unbekannte Verbindung X angetroffen werden. Die Chromatogramme der Rohhydrolysate zeigten die bei *A. rancens* besprochenen Verzerrungen und Flocke, die sich durch den Kationenaustauscher wieder zum Verschwinden bringen ließen.

b) Die papierchromatographische Untersuchung des Zellproteins von *A. lovaniense*, der aber auf dem gleichen komplexen Medium wie *A. rancens* gewachsen war, ergab bezüglich der Aminosäuren eine qualitative Übereinstimmung mit jenen des gleichen aber auf Frateur-Lösung gewachsenen Stammes; auch die mengenmäßige Abschätzung führte im wesentlichen zu einem übereinstimmenden Ergebnis.

III. Das Proteinhydrolysat des ebenfalls haplotrophen *A. aceti* stimmte qualitativ und der Reihung nach weitgehend mit jenem des *A. lovaniense* überein, Lysin jedoch mußte mengenmäßig höher eingeschätzt werden, so

daß es in die I. Gruppe vorrückte. Eine geringfügige Erhöhung war auch bei Histidin festzustellen. Die fragliche Substanz X trat auch hier wieder auf.

IV. Das zu den Versuchen benutzte Hefeautolysat wies die gleichen Aminosäuren wie die Proteinhydrolysate der untersuchten Essigbakterien auf, mit Ausnahme von Methionin und α -Aminobuttersäure, die im Hefeautolysat nicht nachgewiesen werden konnten; dafür enthielt dieses die in den Bakterienproteinen nicht oder nur in Spuren feststellbare γ -Aminobuttersäure.

V. Wie aus den vorstehenden Ausführungen hervorgeht, bestehen unter den Aminosäuren, welche die Proteine der haplotrophen, sich auf einfachste Weise ernährenden *A. lovaniense* und *A. aceti* einerseits und jene des wuchsstoffheterotrophen, eine komplexe Nahrung verlangenden *A. rancens* aufbauen, qualitativ und auch größenordnungsmäßig keine wesentlichen Unterschiede. Selbst durch starke Änderung der Ernährungsbedingungen ergibt sich — wie bei *A. lovaniense* gezeigt werden konnte — keine wesentliche Änderung der Proteinzusammensetzung.

VI. Die vorstehenden Untersuchungen scheinen die vor allem durch KANDLER u. ZEHENDER (1956) vertretene Ansicht zu stützen, daß alle Bakterien eine besondere Grundgaritur an Aminosäuren besitzen, an die der Ablauf der normalen Lebensvorgänge gebunden ist. Daß die von den genannten Autoren an *A. xylinum* durch Schätzung ermittelte Reihenfolge der einzelnen Aminosäuren mit der durch uns nach der gleichen Methode an *A. rancens*, *A. lovaniense* und *A. aceti* festgestellten nicht vollkommen übereinstimmt, könnte auch an der Ungenauigkeit der Schätzungsmethode liegen. Auch die quantitative Bestimmung essentieller Aminosäuren in *Acetobacter suboxydans* PRL G1 durch REUSSER, SPENCER u. SALLANS (1957) lieferte eine etwas andere Reihung.

Eine Sonderstellung scheinen neben Methionin und α, ϵ -Diaminopimelinsäure auch die beiden Aminobuttersäuren einzunehmen. Die von uns nachgewiesene α -Aminobuttersäure wurde bisher nur in wenigen Bakterienproteinen angetroffen. In Übereinstimmung mit den Feststellungen von WORK u. DEWEY (1953) an gramnegativen Bakterien konnte γ -Aminobuttersäure von uns in den Proteinen von *A. lovaniense* und *A. aceti* nicht, in jenen des *A. rancens* mitunter und dann nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden. Das durch KANDLER u. ZEHENDER (1956) ebenfalls beobachtete Auftreten dieser Säure könnte sekundär durch Decarboxylierung von Glutaminsäure, z. B. durch das als Desinfektionsmittel zugesetzte Phenol verursacht sein, worauf die genannten Autoren selbst hinweisen.

Zusammenfassung

Drei *Acetobacter*-Arten mit zum Teil ähnlichen biochemischen Fähigkeiten aber wesentlich verschiedenen Ernährungserfordernissen, nämlich die haplotrophen Arten *A. lovaniense* und *A. aceti* einerseits und der

eine wesentlich komplizierter zusammengesetzte Nahrung benötigende *A. rancens* andererseits, wurden unter den zunächst ermittelten ernährungsphysiologischen Minimalbedingungen in submerser Kultur gezogen und die Hydrolysate der von ihnen gebildeten Proteine papierchromatographisch untersucht.

Hierbei ergab sich, daß die drei Essigbakterien-Arten Proteine bilden, die qualitativ gleichartig sind und auch mengenmäßig keine wesentlichen Unterschiede erkennen lassen, soweit sich dies mit der geübten Schätzmethode feststellen läßt. Ein gleiches Resultat ergab sich auch dann, wenn dem haplotrophen *A. lovaniense* die komplexe Nahrung des *A. rancens* geboten wurde.

Daraus geht hervor, daß auch bei stark abweichenden Ernährungserfordernissen anscheinend dieselbe Grundgarnitur an Aminosäuren gebildet wird. Die α -Aminobuttersäure und die α,ϵ -Diaminopimelinsäure dürften im Hinblick auf ihr bloß gelegentliches Auftreten kaum zu derselben zu rechnen sein.

Literatur

- BOISSONAS, R. A.: Helv. chim. Acta **33**, 1966—1971 (1950). — BUKATSCH, F., K. BURGER u. M. SCHLÜTER: Zbl. Bakt. II. Abt. **109**, 226—235 (1956).
- CAMIEN, M. N., A. J. SALLE and M. S. DUNN: Arch. Biochem. **8**, 67—78 (1945). — CONSDEN, R., A. H. GORDON and A. J. P. MARTIN: Biochem. J. **38**, 224—232 (1944). — CUMMINS, C. S., and H. HARRIS: J. gen. Microbiol. **14**, 583 (1956).
- FRATEUR, J.: Cellule **53**, 287—392 (1950). — FREELAND, J. C., and E. F. GALE: Biochem. J. **41**, 135—138 (1947).
- GSUR, J.: Diss. philos. Fak. Univ. Wien (1953).
- HOYER, D. P.: Leidener Diss., Delft 1898; Die dtsh. Essigind. **3**, 1 (1899).
- JANKE, A.: Zbl. Bakt. II. Abt. **45**, 1—50 (1916). — Arch. Mikrobiol. **17**, 155—159 (1952). — Zbl. Bakt. II. Abt. **110**, 728—739 (1957). — Die Essigsäure-Gärung. In: Handb. Pflanzenphysiol. Bd. XII. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1958 (im Druck).
- KANDLER, O., u. C. ZEHENDER: Arch. Mikrobiol. **24**, 41—48 (1956). — KAWERAU, E., and TH. WIELAND: Nature (Lond.) **168**, 77 (1951). — KELLNER, W., u. H. MARTIN: Naturwissenschaften **41**, 164 (1954).
- POLSON, A.: Biochim. biophys. Acta **2**, 575—581 (1948). — POLSON, A., V. M. MOSLEY and R. W. G. WYCKOFF: Science **1947**, 603.
- RAO, M. R. R., and J. L. STOKES: J. Bact. **65**, 405—412 (1953a); **66**, 634—638 (1953b). — RAO, N. A. N., and T. K. WADHWANI: J. Bact. **72**, 12—15 (1956). — RASUMOFKAJA, S. G., u. T. S. BJELOUSOWA: Mikrobiologija **21**, 403—407 (1952) [russ.]. — REUSSER, F., J. F. T. SPENCER and H. R. SALLANS: Canad. J. Microbiol. **3**, 721—728 (1957). — RIPPEL-BALDES, A., G. BUSCH u. F. RADLER: Arch. Mikrobiol. **23**, 423—430 (1956).
- SHIMWELL, J. L.: J. Inst. of Brew. **60**, 136—141 (1954). — STOKES, J. L., and M. GUNNESS: J. Bact. **52**, 195—207 (1946).
- TURBA, F.: Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1954.
- WORK, E.: Nature **165**, 74—75 (1950). — WORK, E., and D. L. DEWEY: J. Gen. Microbiol. **9**, 394—409 (1953).

(From Scripps Institution of Oceanography, University of California, La Jolla, California)

Schwellenkonzentrationen verschiedener Stickstoffquellen für die Vermehrung einiger Bakterien aus nährstoffarmen Gewässern* **

Von

HOLGER W. JANNASCH

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 24. April 1958)

In einer zusammenfassenden Darstellung führt GIBSON (1957) aus, daß die Verbreitung und physiologische Aktivität der Mikroorganismen im natürlichen Substrat in erster Linie von der Gegenwart verfügbarer Nährstoffe abhängen. Dabei ist eine ungelöste Frage, in welcher Weise die Bakterien auf die extrem niedrigen Nährstoffkonzentrationen vieler Gewässer und Böden reagieren, von denen sie — oft in großer Zahl — isoliert werden können.

Die Menge der bakteriellen Stoffwechselprodukte einer derartigen Substratprobe ist zu gering für den quantitativen Nachweis. Kulturelle und mikroskopische Zählungen der Bakterien als indirektes Maß ihrer Stoffwechseltätigkeit führten andererseits in vergleichbaren Gewässern zu unterschiedlichen Ergebnissen. Ausgesprochen hohe Zahlen in den Größenordnungen 10^3 bis 10^6 /ml wurden mit mikroskopischen Methoden im nährstoffarmen Pelagial großer stehender Gewässer gefunden (KUZNETSOV u. KARSINKIN 1931; BUTKEVICH 1938; KRISS 1945; JANNASCH u. JONES 1959). BUTKEVICH u. BUTKEVICH (1936) stellten durch den Vergleich mit dem O_2 -Verbrauch der Wasserproben fest, daß eine erhebliche Anzahl der direkt nachgewiesenen Bakterien physiologisch inaktiv sein muß. Andere Autoren haben auf kulturellem Wege niedrigere Bakterienzahlen gefunden als nach der vorhandenen Menge organischer Stoffe zu erwarten waren und schließen auf das Vorkommen von Antibiotica oder auf antagonistische Wechselwirkungen (ZOBELL 1936; KRASILNIKOV 1938; STEEMANN NIELSEN 1955).

Um die schwierige Bewertung der Zählergebnisse von Untersuchungen komplexer natürlicher Substrate mit ihren nicht weniger komplexen Bakterienpopulationen zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit ein experimenteller Weg beschritten. Für einige aus nährstoffarmen

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPET zum 70. Geburtstag gewidmet.

** Contribution from the Scripps Institution of Oceanography, New Series.

Gewässern isolierte Bakterien wurden das Vorhandensein und die Höhe der Stickstoffkonzentration des Mediums festgestellt, unterhalb derer keine Zellvermehrung mehr stattfindet (Schwellenkonzentration). Der Stickstoff wurde von WAKSMAN u. CAREY (1935) u. a. als der wesentliche Minimumfaktor für das Bakterienwachstum in verschiedenen Gewässern gefunden. Ein experimentell gefundener Schwellenwert ist relativ. Er hängt von den Kulturbedingungen ab, von der Populationsdichte und den Kriterien, die für den Nachweis des Bakterienstoffwechsels gewählt werden.

Untersuchungen über die Abhängigkeit des Bakterienwachstums von der Nährstoffkonzentration zeigten bei Kulturen hoher Populationsdichte, daß es proportional erfolgt, bis ein Minimum- oder anderer wachstumsbegrenzender Faktor auftritt (MONOD 1942). Die Notwendigkeit einer getrübten Zellsuspension zur Ermöglichung der optischen Messung der Zunahme organischer Substanz macht jedoch eine Untersuchung des Einflusses geringster Substratkonzentrationen unmöglich. So wird bei MONOD (1942) und HINSHELWOOD (1946) die Kurve der Abhängigkeit der Populationsdichte von den Konzentrationen verschiedener Nährstoffe durch den beiderseitigen Nullpunkt verlaufend interpoliert. Danach bestände keine Schwellenkonzentration, eine Tatsache, die durch Untersuchungen mit geringen Populationsdichten noch nicht bestätigt worden ist (LAMANNA u. MALLETT 1953). VIRTANEN u. DE LEY (1948) fanden eine Hemmung der Enzymsynthese bei *Escherichia coli* nach Verminderung der Stickstoffkonzentration des Mediums und geben damit einen Anhaltspunkt für die Existenz von Schwellenwerten.

Methode

Das Medium. Die Zusammensetzung eines künstlichen stickstoff-freien Süßwassermediums mittleren Salzgehaltes (Tab. 1) entsprach Durchschnittswerten von CLARK (1924) und RODHE (1949) für die wichtigsten Kationen und Anionen. Spurenelemente wurden nach Vorschlägen von CHU (1949) zugesetzt. Weiterhin wurden die in letzter Zeit häufig beobachteten wachstumsfördernden Eigenschaften mancher chelatbildender Stoffe in Verbindung mit Metallionen berücksichtigt (WEINBERG 1957 a; SCHEFFER u. Mitarb. 1957), deren Vorhandensein in natürlichen Gewässern sehr wahrscheinlich ist. Verwendet wurden Citrat, Kojisäure (WEINBERG 1957 a u. b) und Äthylendiamin-tetraessigsäure (EDTA, PROVASOLI et al. 1957) bei einem pH von 7,0—7,2. Der Gesamtgehalt an verunreinigendem Stickstoff der Chemikalien betrug maximal 0,8 γ /l. Es wurde darauf geachtet, daß die Lösung so wenig wie möglich mit ungereinigter Laborluft in Berührung kam.

Die Organismen und die Herstellung der N-Mangelkulturen. 44 Bakterienstämme wurden aus verschiedenen nährstoffarmen Gewässern auf folgendem Medium isoliert: Glucose 1 g; Pepton 0,1 g; NH_4NO_3 0,1 g; K_2HPO_4 0,1 g; Agar 15 g; Leitungswasser 1000 ml. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von MACLEOD et al. (1954) und JONES (1957) war die Mehrzahl der Reinkulturen (37) nicht vitaminbedürftig. Je ein Vertreter der drei vorherrschenden Gruppen wurde nach BERGEYS Manual (1948) bestimmt: *Flavobacterium aquatile* Frankland u. Frankland, *Aero-*

bacter aerogenes Kruse, *Bacillus subtilis* Flügge. Die Reinkulturen wurden im N-freien Medium ohne Glucosezusatz aufbewahrt, wobei sich nach etwa 6 Wochen eine Keimzahlverminderung um 60—80% zeigte.

Die Anreicherung der Zellsuspension fand in 2 l-Kulturen des oben angegebenen Isoliermediums ohne Agarzusatz bei 20—23° C statt. Nach 24 Std wurde die leicht getriebte Zellsuspension abfiltriert, gewaschen und nach direkter Bestimmung der Zelldichte (siehe unten) einer 5 l-Kultur des N-freien Süßwassermediums zugesetzt. Die berechnete Zelldichte von etwa 5000/ml wurde alle 24 Std erneut gemessen. War ein Unterschied der Zellzahlen zweier aufeinanderfolgender Bestimmungen statistisch nicht mehr gesichert (siehe unten), dann wurde angenommen, daß keine

Tabelle 1. Bestandteile des künstlichen Süßwassermediums in mg/l

NaHCO ₃	21,0	K ₂ HPO ₄	1,5	Glucose	10,0
KCl	7,0	FeCl ₃	0,1		
MgCl ₂	5,0	MnCl ₂	0,2	Na-Citrat	1,0
CaCO ₃	82,0	Al(SO ₄) ₃	0,2	Kojisäure	1,0
MgSO ₄	29,0	Salzgehalt	148,0	EDTA	1,0
NaSiO ₃	2,0				

weitere Vermehrung — auf Grund von Reserve-N — stattgefunden hat. Dieses „Aushungern“ der Organismen fand bei 32° C statt und dauerte 4—10 Tage. Die so gewonnenen N-Mangelkulturen wurden durch Filtrieren durch Membranfilter konzentriert, ihre Dichte bestimmt und in berechneter Menge 100 ml des N-freien Mediums in 200 ml-Erlenmeyerkolben zugesetzt, so daß die anfängliche Zellzahl in diesen Kulturen etwa 5000/ml betrug. Diese Zellzahl wurde ebenfalls mit der Plattenmethode kontrolliert.

Die Stickstoffquellen. Als N-Quellen wurden verwendet: NH₄Cl, KNO₃, Bacto-Pepton (Difco, 22,5% N) und 24 Std bei 100° C in 6 n HCl hydrolysiertes Bacto-Pepton, weiterhin ein Gemisch von Aminosäuren (zusammengestellt nach Analysen von PETERSON et al. (1925) von Proben aus dem Mendota Lake): Tyrosin 90 mg, Tryptophan 70 mg, Histidin 80 mg, Cystin 20 mg, Arginin 190 mg, dest. Wasser 100 ml. 1 ml dieser Lösung enthält 1 mg Amino-N. Die berechneten Konzentrationen des Stickstoffes nach Zusatz der N-Quellen zu den Kulturen betrugen: 500; 250; 100; 75; 50; 25; 10; 5; 1 und etwa 0,5 γ /l.

Die Kultur. Die beimpften und mit der N-Quelle versehenen Kulturen wurden bei schwachem Schütteln in einem improvisierten Brutschrank bei 20—22° C aufbewahrt. Um bei den mit Wattestopfen verschlossenen Kulturgefäßen den Einfluß des Ammoniaks aus der Laborluft auszuschalten, wurde der Brutschrank ständig von Luft durchströmt, die vorher ein Säurebad passiert hatte. Kontrollkulturen mit N-freien Medien zeigten in mehreren Fällen deutliches Wachstum, wenn diese Maßregel nicht getroffen wurde.

Die Zählung. Die Bakterienvermehrung wurde mit der mikroskopischen Zählung der Zellen auf Membranfiltern (JANNASCH 1953) und der Kochschen Plattenmethode bestimmt. Die Membranfiltermethode hat

den Vorteil, daß die Ergebnisse in etwa 20 min vorliegen und der Verteilungsfehler durch Vermehrung der auszuzählenden Gesichtsfelder (n') verkleinert werden kann. Soll der Mittelwert ($\bar{x}$) der Zählwerte je Gesichtsfeld (Z) einen mittleren Fehler ($S_{\bar{x}}$) von 1% haben $\left(\frac{S}{\bar{x}} = 0,01\right)$, dann kann nach Errechnung der Varianz $\left(S^2 = \frac{\sum(Z - \bar{x})^2}{n-1}\right)$ die Zahl der auszuzählenden Gesichtsfelder $\left(n' = \frac{S^2}{S_{\bar{x}}^2}\right)$ errechnet werden. Der Nachteil der mikroskopischen Methode ist, daß in älteren N-Mangelkulturen die Erkennbarkeit der Zellen (Größe und Färbbarkeit) abnehmen kann. Der mittlere Fehler der Plattenmethode (Medium siehe S. 115) kann bei 10 Parallelplatten bis zu etwa 8% betragen. Verklumpungen der Zellen oder Kettenbildungen, die nach JENNISON (1937) die hauptsächliche Fehlerquelle der Plattenmethode darstellen, wurden bei den parallelen mikroskopischen Untersuchungen nicht beobachtet.

Da bei diesen Zählungen die Feststellung wesentlich ist, ob bei einer bestimmten N-Konzentration tatsächlich eine Zellvermehrung stattgefunden hat oder nicht, wurde in allen Zweifelsfällen die statistische Sicherheit mit dem t -Test (FISHER 1950; SNEDECOR 1956) überprüft. Die Varianzen der Zählwerte zu Beginn und nach Beendigung der Kultur wurden summiert ($S_I^2 + S_{II}^2 = S_s^2$). Der mittlere Fehler ist hier $S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{2 S_s^2}{n}}$. Der t -Test $\left(t = \frac{\bar{x}_I - \bar{x}_{II}}{S_{\bar{x}}}\right)$ gibt an, mit wieviel Prozent Wahrscheinlichkeit der gefundene Unterschied zwischen den beiden Zählergebnissen existiert. Wird 95% erreicht, gilt der Unterschied als statistisch gesichert.

Ergebnisse

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Bakterienvermehrung von der Kulturdauer bei vier verschiedenen NH_4^+ -N-Konzentrationen untersucht. Das Ergebnis für *Flav. aquatile*, das sich am empfindlichsten erwies und noch eine nachweisbare Vermehrung bei $< 1,0 \gamma \text{ NH}_4^+$ -N/l zeigte, gibt Abb. 1 wieder. Unterhalb der NH_4^+ -N-Konzentration von $100 \gamma/\text{l}$ wurde in allen Fällen zwischen 76 und 96 Std eine nahezu konstante Zellzahl je Konzentrationsstufe gefunden, d. h. nach reichlich 3 Tagen war keine Vermehrung mehr nachweisbar und vor etwa 4 Tagen noch keine Abnahme der Zellzahl.

Von dieser Tatsache ausgehend wurde für die nähere Bestimmung der Schwellenkonzentrationen eine einheitliche Wachstumsperiode von 4 Tagen gewählt. Im folgenden wird von Vermehrung in der Kultur mit einer bestimmten N-Konzentration gesprochen, wenn die Zellzahl nach dieser Zeit eindeutig höher war (Tab. 2) als die Ausgangszellzahl A ($\Delta Z=0$). Zwischen dieser N-Konzentration und der nächst geringeren, in deren Kultur die Zellzahl kleiner als A war, liegt die eigentliche Schwellenkonzentration. Waren in allen Kulturen mit geringeren N-Konzentrationen die Zell-

zahlen nicht eindeutig kleiner als A , dann wurde die niedrigste N-Konzentration, die noch eine Vermehrung hervorrief, mit dem Vorzeichen $<$ angegeben (Tab.3). — Eine genauere Bestimmung der Schwellenkonzentration (a) durch Ermittlung des Schnittpunktes der errechneten Geraden

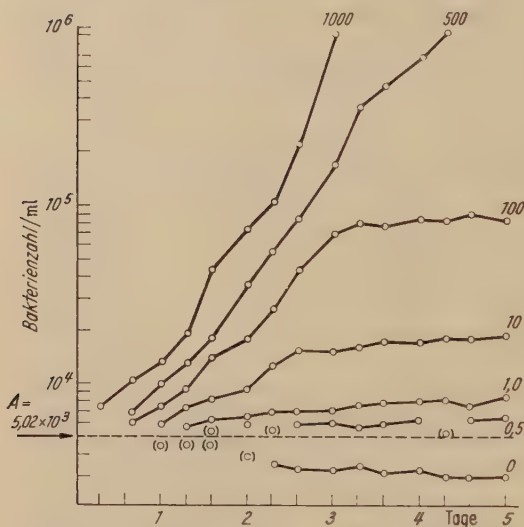


Abb. 1. Vermehrung von *Flav. aquatilis* in Abhängigkeit von der Zeit für verschiedene Konzentrationen von $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (in g/l). Für die eingeklammerten Werte war der t -Test negativ

$\Delta Z = a + kN$ (k = Konstante, N = N-Konzentration) mit der Konstanten $\Delta Z = 0$ war nicht möglich, weil in diesem Bereich offensichtlich kein proportionales Verhältnis zwischen ΔZ und N besteht (Abb. 2, I).

In einem Vorversuch wurde die Wirksamkeit der dem Medium zugesetzten Chelatbildner untersucht (Tab. 2). Die Vermehrung in Abhängigkeit zu verschiedenen Aminosäuregemisches (siehe S. 116) zeigte keinen Unterschied im reinen Medium (+ Glucose) und nach Zusätzen von Citrat und Kojisäure. Eine deutliche Vermehrungsförderung trat bei

Tabelle 2. Vermehrung von *Bac. subtilis* (Zellzahl in $10^3/\text{ml}$) in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen eines Gemisches von Aminosäuren (siehe S. 116) und einiger Chelatbildner

Der t -Test gibt an, ob die jeweilige Zellzahl kleiner, größer oder statistisch indifferent zu der Zellzahl A bei Beginn der Kultur ist. Die Schwellenkonzentrationen des Amino-N liegen im Bereich der fettgedruckten Zahlen

Amino-N in g/l	Medium ohne Zusatz ¹ $A = 4,87$	t -Test	Medium + EDTA $A = 5,10$	t -Test	Medium + Citrat $A = 4,91$	t -Test	Medium + Kojisäure $A = 4,73$	t -Test	Medium ohne Zusatz ² $A = 4,44$	t -Test
0	3,30	$< A$	4,82	$\approx A$	2,83	$< A$	2,27	$< A$	2,15	$< A$
1	2,88	"	3,19	$< A$	2,62	"	3,35	"	3,19	"
10	3,11	"	5,51	$\approx A$	4,06	"	2,17	"	2,78	"
25	3,98	"	6,94	$> A$	3,84	"	3,42	"	3,24	"
50	5,49	$\approx A$	7,48	"	4,60	$\approx A$	3,99	$\approx A$	3,01	"
75	6,16	$> A$	7,94	"	6,71	$> A$	5,32	"	5,50	$\approx A$
100	22,32	"	18,66	"	35,10	"	6,65	$> A$	8,11	$> A$
500	165,80	"	135,80	"	204,70	"	95,10	"	120,50	"

¹ Glucose und Phosphat gemeinsam.

² getrennt autoklaviert.

Zusatz von EDTA auf, wobei die Möglichkeit besteht, daß sein Amin-N-Gehalt von etwa 3% als N-Quelle benutzt wird. Dieser Verdacht wurde bestärkt durch das Ergebnis eines zusätzlichen Versuches, bei dem das reine Medium — aber nach getrenntem Autoklavieren der Glucose und des anorganischen Phosphates — verwendet wurde. Nach RAMSEY u. LANKFORD (1956) entsteht beim gemeinsamen

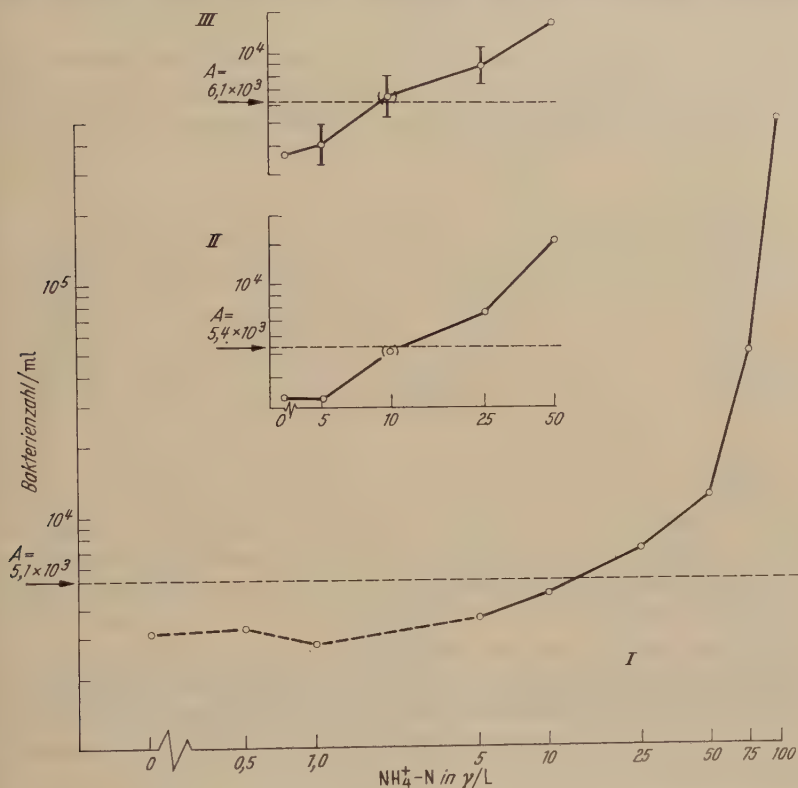


Abb. 2. Vermehrung von *Flav. aquatile* nach einer Kulturdauer von 4 Tagen in Abhängigkeit von der $\text{NH}_4^+\text{-N}$ -Konzentration. I und II Zählung auf Membranfilter, III Plattenzählung. A Zellzahl bei Beginn der Kultur. Für die eingeklammerten Werte in II und III war der t-Test negativ

Autoklavieren von Glucose und Phosphat ein Produkt, das ebenfalls die wachstumsfördernden Eigenschaften mancher chelatbildender Verbindungen besitzt. Daß derartige Stoffe Metallionen in toxischer Konzentration binden oder in sehr geringer Konzentration für die Organismen verfügbar machen (WEINBERG 1957 a), ist jedoch keine eigentliche Erklärung für den hier beobachteten Effekt (Tab. 2): Die Senkung des Schwellenwertes der $\text{NH}_4^+\text{-N}$ -Konzentration. SERGEANT et al. (1957) bemerken allerdings, daß der „GP-Faktor“ (Glucose-Phosphat) die Zellteilung beschleunigt, ohne einen Einfluß auf die gebildete Menge der Zellsubstanz zu haben. Die folgenden Untersuchungen wurden daher ohne die Zusätze der genannten Stoffe vorgenommen.

Die Lage des Schwellenwertes unter den willkürlich gewählten Konzentrationsstufen der verschiedenen N-Quellen für die Vermehrung der

3 Organismen wurde zuerst mit Hilfe der direkten Bakterienzählung in je 3 Parallelkulturen festgestellt (Abb. 2, I). Die Untersuchung wurde für die letzten 2 negativen und ersten 2 positiven N-Konzentrationen wiederholt (Abb. 2, II). Eine weitere Kontrolle fand mit der Plattenmethode statt, deren Ergebnisse in Abb. 2, III zusammen mit dem Fehlerbereich wiedergegeben sind. Obgleich der Zählfehler der direkten Methode weit geringer ist, sind hier die Ergebnisse der kulturellen Methode wertvoller, weil nach ZIEGLER u. HALVORSON (1935) sowie JENNISON (1937) bei den hier angewendeten Kulturbedingungen mit der Gegenwart von inaktiven oder nicht-vermehrungsfähigen Zellen zu rechnen ist.

Tabelle 3. Bereiche der Schwellenkonzentrationen des Stickstoffes (in mg/l) in verschiedener chemischer Bindung für die Vermehrung dreier Bakterienstämme

	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	Amino-N des A.S. Gemisches	Pepton-N	Pepton-Hydrolysat-N
<i>Flav. aquatile</i>	< 1	100—250	50—100	10—50	< 25
<i>Aerob. aerogenes</i>	10—75	100—500	100—250	75—100	75—100
<i>Bac. subtilis</i>	< 50	10—50	25—100	50—100	< 25

Die Ergebnisse zeigen die Existenz von Schwellenkonzentrationen des Stickstoffes unter den gegebenen Bedingungen. Bei höheren Konzentrationen wurde kein proportionales Verhältnis zwischen Zellvermehrung und zugegebener N-Menge gefunden. In der Übersicht der Ergebnisse für alle 3 Stämme (Tab. 3) fallen in erster Linie auf: 1. Die relativ hohen Schwellenkonzentrationen von $\text{NO}_3^-\text{-N}$ für *Flav. aquatile* und *Aerob. aerogenes*, 2. die im Vergleich dazu geringen Schwellenkonzentrationen von $\text{NH}_4^+\text{-N}$ und Pepton-Hydrolysat-N für alle 3 Organismen und 3. die relativ hohen Schwellenkonzentrationen aller N-Quellen für *Aerob. aerogenes*.

Bei der mikroskopischen Auszählung der Bakterien wurde eine verschiedene durchschnittliche Zellgröße in Abhängigkeit von der N-Konzentration der Kultur beobachtet, eine Erscheinung, die in HENRICIS Monographie (1928) eingehend behandelt wird. Die Messung von 300 bis 500 Zellen je Kultur mit einem Okular-Schraubenmikrometer führte allerdings nur bei *Bac. subtilis* zu Werten, die sich auf der 95% Basis statistisch sichern ließen. Sie werden in Abb. 3 (G) lediglich als Faktor der Größenzunahme linear angegeben, ausgehend von dem Durchschnittswert der Zellgrößen zu Beginn der Kultur. Bei Vernachlässigung der räumlichen Struktur der Zellen ergibt das Produkt dieser Größenfaktoren und der Zellzahl einen hypothetischen Wert für die gebildete Zellsubstanz, der in Abb. 3 (H) als Zahl gleichgroßer Zellen mit dem Größenfaktor 1 wiedergegeben wird. Die genaue und absolute Bestimmung der

gebildeten Zellsubstanz ist bei den Konzentrationen von 0,1–10 γ Trockensubstanz je 100 ml nicht möglich. Die Schätzung zeigt, daß eine Bildung von Zellsubstanz bereits bei geringeren NH_4^+ -N-Konzentrationen auftritt, als sie durch Zellvermehrung in Erscheinung tritt. Einen Vergleich mit der Reaktion des Betriebsstoffwechsels auf geringe N-Konzen-

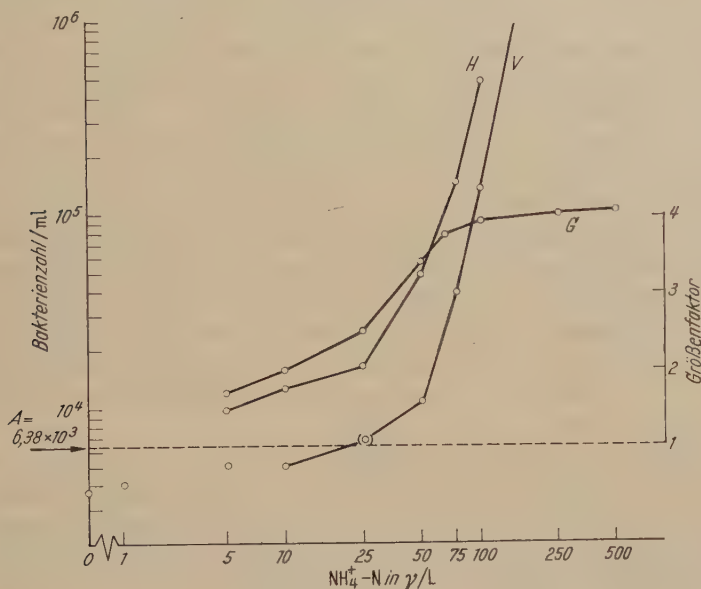


Abb. 3. Vermehrung (V) und relative Größenzunahme (G) der Zellen von *Bac. subtilis* nach einer Kulturdauer von 4 Tagen in Abhängigkeit von der NH_4^+ -N-Konzentration. H aus V und G geschätzte Zunahme der Bakteriensubstanz als Zahl von Zellen mit dem Größenfaktor 1. A Zellzahl bei Beginn der Kultur. Für den eingeklammerten Wert war der *t*-Test negativ

trationen des Mediums ermöglichen die Ergebnisse von ZOBELL u. GRANT (1943). Sie fanden mit Rohkulturen einen noch nachweisbaren O_2 -Verbrauch bei 250 γ Pepton/l (etwa 50 γ Pepton-N/l).

Diskussion

Aus der zusammenfassenden Darstellung von HUTCHINSON (1957) geht hervor, daß die niedrigsten Gehalte an gebundenem Stickstoff in einer großen Zahl untersuchter Seen durchschnittlich bei 10–50 γ/l lagen, wobei der im Seeton enthaltene Stickstoff nicht berücksichtigt ist. Die Mehrzahl der N-Konzentrationen sind danach in natürlichen Gewässern höher als die gefundenen Schwellenwerte der vermehrungsbegrenzenden N-Konzentrationen für die untersuchten Bakterien. Es kann daraus jedoch nicht der Schluß gezogen werden, daß der Stickstoff in solchen Gewässern als Minimumfaktor nicht in Frage kommt. Abgesehen davon,

daß die Organismen auf Stickstoff in verschiedener chemischer Bindung ungleich reagieren, ist die Verfügbarkeit der N-Quelle von komplexen chemischen und physikalischen Faktoren des natürlichen Mediums abhängig. Die Untersuchungen von WAKSMAN u. CAREY (1935), VON BRAND et al. (1939, 1941 u. 1942) und SCOPINTZEV u. BROOK (1940) sprechen dafür, daß nur ein Teil des in natürlichen Gewässern nachweisbaren Stickstoffes für die Bakterien verfügbar ist. Weiterhin wird ein Vergleich mit den natürlichen Verhältnissen erschwert durch die ungeklärte Frage der Anpassung der Mikroorganismen an die hohen Nährstoffkonzentrationen während der Isolierung und Reinzucht.

Der Vergleich der gefundenen Schwellenkonzentrationen des Stickstoffes in organischer Bindung für die Bakterienvermehrung zeigt, daß der größere Gehalt des Peptonhydrolysates an freien Aminosäuren und NH_3 dem unbehandelten Pepton gegenüber die Assimilation des Stickstoffes bereits bei geringeren Konzentrationen ermöglicht. Das Gemisch der von PETERSON et al. (1925) im Wasser des Mendota Lake gefundenen Aminosäuren war nur für *Bac. subtilis* in verhältnismäßig geringer Konzentration verwendbar. Es ist möglich, daß ihr Vorkommen im natürlichen Substrat auf ihre schwere Angreifbarkeit zurückzuführen ist.

Nach KORINEKS Definition (1932) sind Bakterien „oligo-nitrophil“, wenn sie auf Agarnährböden ohne Stickstoffzusatz Kolonien zu bilden vermögen. Auf Flüssigkeitskulturen bezogen entsprechen etwa 700 γ N/l dem Stickstoffgehalt der verwendeten Agarmenge. Eine NH_4^+ -N-Konzentration dieser Höhe ergab eine Trübung der Kulturen von *Flav. aquatile* und *Bac. subtilis*, nicht aber von *Aerob. aerogenes*.

Es ist von limnologischem Interesse, daß die Schwellenkonzentrationen anorganischen Stickstoffes für die Vermehrung von planktischen Algen einen ähnlichen Bereich umfassen wie die hier für Bakterien gefundenen. LUND (1950) fand für *Asterionella*, daß sie sich noch unter 100 γ N/l vermehren kann. BARKER (1935) gibt einen Konzentrationsbereich von 1—10 γ N/l für marine Dinoflagellaten an. *Pediastrum* ist nach ALEEV u. MUDRETZOVA-VISS (1936) noch bei 2 γ N/l fähig, zu wachsen. CHU (1943) fand eine bessere Aufnahme des NO_3^- -N als des NH_4^+ -N bei mehreren planktischen Algen. Der umgekehrte Fall wird von ALEEV u. MUDRETZOVA-VISS (1936), HARVEY (1940) sowie PEARSALL u. LOOSE (1937) beschrieben. BUTKEVICH u. BOGDANOVA (1939) fanden in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen, daß NH_4^+ -N für Bakterien die bevorzugte N-Quelle darstellt. Stämme, die NO_3^- -N verarbeiteten, konnten auch NH_4^+ -N verwenden, nicht aber umgekehrt. Nach STANIER et al. (1957) gilt allgemein die Auffassung, daß die notwendige Reduktion des NO_3^- -N maßgebend für seine Verwendung als N-Quelle ist. ÖSTERLIND (1947) führt aus, daß der pH bei der Verfügbarkeit von NH_4^+ -N und NO_3^- -N

für die Organismen eine große Rolle spielt, und nach HUTCHINSON (1957) sind die oft stark schwankenden $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ -Verhältnisse in natürlichen Gewässern ein wichtiger Faktor für die Entwicklung der Mikroflora.

Summary

Minimal growth-limiting concentrations of different nitrogen sources were tested in liquid cultures of *Flavobacterium aquatile*, *Aerobacter aerogenes*, and *Bacillus subtilis* in population densities of approximately 5000 cells/ml. Evidence of multiplication was given by plate counts and microscopic counts on membrane filters. The lowest nitrogen concentrations at which multiplication occurred (threshold concentrations) ranged from < 1 to 500 γ/l and depended upon both the kind of nitrogen source and the organism used (Table 3). *A. aerogenes* proved to require larger concentrations of nitrogen than the two other organisms. Nitrogen of ammonia and of hydrolysed peptone showed lower threshold concentrations than nitrogen of nitrate and untreated peptone, respectively. Microscopic measurement of the cell size indicated formation of cell material of *B. subtilis* at concentrations of ammonia-nitrogen lower than those necessary for multiplication.

Literatur

- ALEEV, B. S., and C. A. MUDRETZOVA-VISS: Microbiology 5, 465—486 (1936) (russ., engl. sum.).
- BARKER, H. A.: Arch. Mikrobiol. 6, 157—181 (1935). — BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology, 6. Ed. (1948). — VON BRAND, T., and N. W. RAKESTRAW: Biol. Bull., Woods Hole 81, 63—69 (1941). — VON BRAND, T., N. W. RAKESTRAW and C. E. RENN: Biol. Bull. 79, 285—296 (1939). — VON BRAND, T., N. W. RAKESTRAW and J. W. ZABOR: Biol. Bull. 83, 273—282 (1942). — BUTKEVICH, V. S.: Microbiology 7, 1005—1027 (1938). — BUTKEVICH, V. S., and I. V. BOGDANOVA: Microbiology 8, 1073—1095 (1939). — BUTKEVICH, N. V., and V. S. BUTKEVICH: Microbiology 5, 322—343 (1936).
- CHU, S. P.: J. Ecology 31, 109—148 (1943). — Science and Technology in China 2, 38 (1949). — CLARKE, F. W.: The Data of Geochemistry. 5. Ed., Bull. U. S. Geol. Surv. (1924).
- FISHER, R. A.: Statistical methods for research workers. Edinburgh: Oliver and Boyd 1950.
- GIBSON, J.: Symp. Soc. gen. Microbiol. 7, 22—41 (1957).
- HARVEY, H. W.: J. Mar. biol. Ass. U. Kingd. 24, 115—123 (1940). — HENRICI, A. T.: Morphologic variation and the rate of growth of bacteria. III. Springfield: Charles C. Thomas 1928. — HINSHELWOOD, C. N.: The chemical kinetics of the bacterial cell. Oxford: Univ. Press 1946. — HUTCHINSON, G. E.: A treatise on limnology. New York: John Wiley 1957.
- JANNASCH, H. W.: Arch. Mikrobiol. 18, 425—430 (1953). — JANNASCH, H. W., and G. E. JONES: Limnol. and Oceanogr. 4, im Druck (1959). — JENNISON, M. W.: J. Bact. 33, 461—477 (1937). — JONES, G. E.: Bact. Proc. Jahrg. 1957, Seite 16.
- KORINEK, J.: Zbl. Bakt., II. Abt. 86, 201—206 (1932). — KRASILNIKOV, N. A.: Microbiology 7, 329—334 (1938). — KRISS, A. E.: Microbiology 14, 268—276 (1945). — KUTNETZOV, S. J., u. G. S. KARSINKIN: Zbl. Bakt. II. Abt. 83, 169—179 (1931).

LAMANNA, C., and M. F. MALLETT: Basic bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins Comp. 1953. — LUND, J. W. G: J. Ecology **38**, 15—36 (1950).

MACLEOD, R. A., E. ONOFREY and M. E. NORRIS: J. Bact. **68**, 680—686 (1954). — MONOD, J.: La croissance des cultures bacteriennes. Paris: Hermann et Cie 1942.

ÖSTERLIND, S.: Nature **159**, 199—200 (1947).

PEARSALL, W. H., and L. LOOSE: Proc. roy. Soc. B **121**, 451—501 (1937). — PETERSON, W. H., and E. B. FRED B. P. DOMOGALLA: J. biol. Chem. **23**, 287—295 (1925). — PROVASOLI, L., J. J. A. McLAUGHLIN u. M. R. DROOP: Arch. Mikrobiol. **25**, 392—428 (1957).

RAMSEY, H. H., and C. E. LANKFORD: J. Bact. **72**, 511—158 (1956). — RODHE, W.: Verh. int. Ver. Limnol. **10**, 377—386 (1949).

SCHAEFFER, F., B. ULRICH u. P. HISTERMANN: Z. Pflanzenernährg. **76**, 146—155 (1957). — SCOPITZEV, B. A., and E. A. BROOK: Microbiology **9**, 594—607 (1940). — SERGEANT, T. P., C. E. LANKFORD and R. W. TRAXLER: J. Bact. **74**, 728—736 (1957). — SNEDECOR, G. W.: Statistical methods. Ames: The Iowa State College Press 1956. — STANIER, R. Y., M. DOUDOROFF and E. A. ADELBERG: The microbial world. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J. (1957). — STEEMANN NIELSEN, E.: Nature (Lond.) **176**, 533 (1955).

VIRTANEN, A. I., u. J. DE LEY: Arch. Biochem. **16**, 169—176 (1948).

WAKSMAN, S. A., and C. L. CAREY: J. Bact. **29**, 531—543 u. 545—561 (1935). — WEINBERG, E. D.: Bact. Rev. **21**, 46—68 (1957). — Bact. Proc. Jahrg. 1957, Seite 54.

ZIEGLER, N. R., and H. D. HALVORSON: J. Bact. **29**, 609—634 (1935). — ZOBELL, C. E.: Proc. Soc. exper. Biol. (N. Y.) **34**, 113—116 (1936). — ZOBELL, C. E., and C. W. GRANT: J. Bact. **45**, 555—564 (1934).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin)

Zur Feinstruktur der *Sarcina ventriculi* *

Von

H. KNÖLL und W. NIKLOWITZ

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. Juli 1958)

Die *Sarcina ventriculi*, die 1842 von JOHN GOODSIR im Mageninhalt eines Kranken entdeckt wurde, gehört zweifellos zu den interessantesten Mikroorganismen, eine ungewöhnlich große, anaerobe Sarcine mit cellulosehaltiger Wand, die bei 37° C in pepton- und zuckerhaltigen Medien wächst.

BEIJERINCK zeigte 1905, daß sie praktisch aus allen Erden isoliert werden kann, wenn man eine geeignete Pepton-Zucker-Lösung so stark ansäuert, daß alle anderen Erdmikroben an der Vermehrung gehindert werden. Dabei geht der pH-Bereich für die Vermehrungsfähigkeit der *S. ventriculi* praktisch von pH 1 (Magensaft!) bis pH 10. In welcher Form die *S. ventriculi* im Erdboden vorkommt, ist noch durchaus ungeklärt. In der Kultur muß sie innerhalb kurzer Zeitabstände (1—3 Tage) in neues Medium übertragen werden; so ist jahrelange Weiterzüchtung möglich.

JAN SMIT (1930) hat den Gärungssarcinen *S. ventriculi*, *S. maxima*, *S. methanica* auf Grund eingehender eigener Untersuchungen eine Monographie gewidmet, die heute noch die Grundlage für die Kenntnis dieser eigenartigen Mikroorganismen darstellt.

Frühere eigene Untersuchungen (HK) verwandten die *Sarcina ventriculi* als Objekt für Versuche zur Konservierung von Mikroorganismen. Das einzige, allerdings erstaunliche Resultat gaben Versuche unseres Mitarbeiters G. KOCH (1948), nach dem die Zugabe minimaler Agarmengen zur Kulturflüssigkeit die Lebensdauer von wenigen Tagen auf 3 Monate erhöht. H. OEHRING (1953) untersuchte in einer Dissertation aus unserem Institut die Empfindlichkeit der *Sarcina ventriculi* gegen Antibiotica und Chemotherapeutica als Vorarbeit zur Gewinnung durch Antibiotica-Resistenz markierter Stämme.

Gleichzeitig mit biochemischen Untersuchungen über die Nucleinsäuren der Gärungssarcinen studierten wir im Zuge unserer elektronenmikroskopischen Substrukturforschung an Mikroorganismen, insbesondere an Bakterien, den Feinbau der *Sarcina ventriculi* mittels der Ultradünnschnittechnik.

Material und Methoden

Zu unseren Untersuchungen verwandten wir *Sarcina ventriculi* Stamm 2, die 16 Std in Malzbrühe (pH 4,8) bei 37° C bebrütet wurde¹.

* Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL-BALDES in tiefer Verehrung zu seinem 70. Geburtstag gewidmet.

¹ Fräulein C. KOCH danken wir für die Anzucht des Untersuchungsmaterials und für die lichtmikroskopische Assistenz.

Die Fixierung und Einbettung des Untersuchungsmaterials erfolgte nach einer Vorschrift, wie sie NIKLOWITZ (1958a) vorgeschlagen und die sich auch für diese Organismengruppe als besonders geeignet erwiesen hat (pH der Fixationsflüssigkeit 7). Die Ultradünnschnitte wurden mit dem Ultramikrotom nach NIKLOWITZ (1955) hergestellt¹. Die Photogramme wurden mit einem elektromagnetischen Übermikroskop (40–100 KV, Werk für Fernmeldewesen „WF“, Berlin-Oberschöne-weide) auf Elektronenplatten (hart, Agfa-Wolfen) aufgenommen.

Ergebnisse

Beim Studium ultradünner Schnitte kann man an der Einzelzelle der *Sarcina ventriculi* einmal die Zellwand mit der Schleimhülle, das Cytoplasma einschließlich der Mitochondrienäquivalente und den Bereich der Kernäquivalente als morphologische Gebilde oder Zellbereiche erkennen, wie sie im nachfolgenden näher beschrieben und analysiert werden sollen. Zum anderen werden Beobachtungen zur Lage der einzelnen Zellen im Zellpaket in Verbindung mit den Beobachtungen zur Zellwand mitgeteilt.

Schleimhülle

Während die Einzelzelle nach außen durch eine Zellwand begrenzt ist, wird das gesamte Zellpaket und in diesem ebenfalls jede einzelne Zelle von einer Schleimhülle umgeben (Abb. 1–10 S). Die Schleimhülle weist dagegen keine distinkte äußere Begrenzung auf und ist selbst nur an den osmiophilen Strukturen zu erkennen, die die einzelnen Zellen umgeben. Diese osmiophilen Strukturelemente der Schleimhülle besitzen amorphen Bau und scheinen andererseits fest an der Zellwand zu haften. Dadurch wird eine scharfe äußere Begrenzung der Zellwand verwischt, und diese ist demnach nur undeutlich zu erkennen. Fädige Aggregationen, wie sie besonders für die Schleimhüllen und -scheiden der Cyanophyceen beschrieben wurden (BRINGMANN 1951, FREY-WYSSLING u. STECHER 1954, METZNER 1955, NIKLOWITZ u. DREWS 1956), konnten am vorliegenden Objekt nicht beobachtet werden. Neuerliche Untersuchungen an verschiedenen anderen Bakterienschleimen wurden von CLAUS u. Mitarb. (1958, daselbst weitere Literaturangaben) und PFENNIG (1958) durchgeführt. Die osmiophilen Strukturen der Schleimhülle sind auch in den Zwischenräumen der einzelnen Zellen innerhalb des Zellpaketes festzustellen. Daraus geht hervor, daß jede einzelne Zelle von einer Schleimschicht vollständig umgeben ist und diese wahrscheinlich die Kittmasse für das Zusammenhaften der Einzelzellen im gesamten Zellpaket darstellt.

Zellwand

Die Zellwand besteht aus zwei Membranen und ist im Mittel 30 $m\mu$ dick. Sie ist bei diesem Untersuchungsobjekt erheblich dicker, als dies besonders für gramnegative Bakterien angegeben und gezeigt wurde

¹ Fräulein W. HILBERT danken wir für die Herstellung der Ultradünnschnitte, Herrn G. WACHSMUTH für die Anfertigung der Aufnahmen.

(TOMLIN u. MAY 1955 u. a.). Die Doppelschichtigkeit der Zellwand ergibt sich aus der Beobachtung, daß hier drei osmiophile Grenzschichten zwei hellere Zwischenlagen einschließen (Abb. 2, 8), wobei allerdings zu bemerken ist, daß die äußere Zwischenlage kompakter und stärker elektronen-

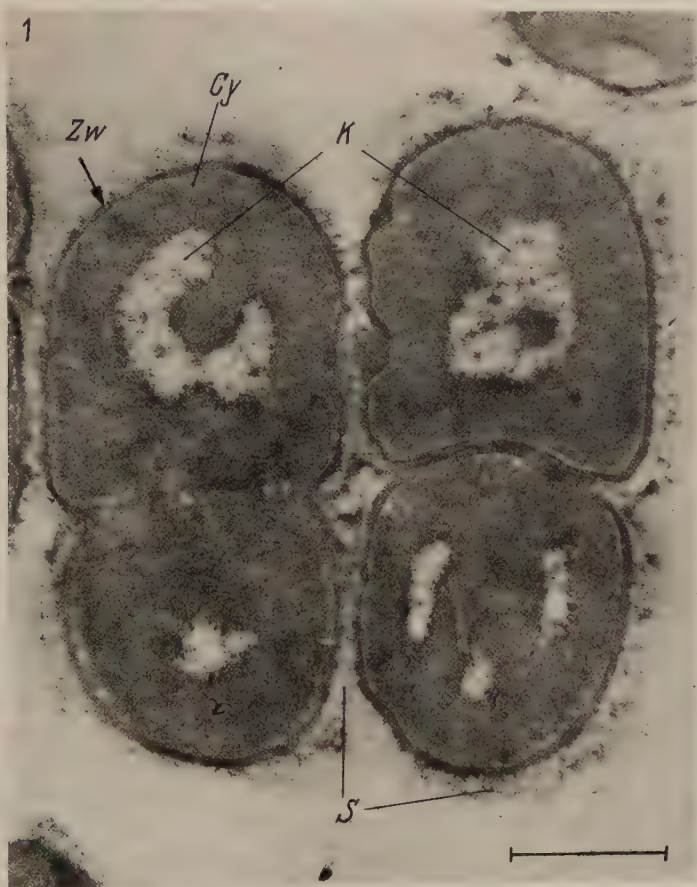


Abb. 1. *Sarcina ventriculi*: Schnitt durch eine Zelle eines Zellpaketes. *Zw* Zellwand, *Cy* Cytoplasma, *K* Kernäquivalent, *S* Schleimhülle. (Abb. 1—10 sind bei einer Originalvergrößerung von 8700:1 aufgenommen und nachvergrößert. Der Strich gibt jeweils die Entfernung von 0,5 μ an)

streuend ist als die innere Zwischenlage. Die Zellwandbeschaffenheit gleicht in sehr starkem Maße dem Aufbau der Zellwände der Cyanophyceen (NIKLOWITZ u. DREWS 1956, 1957). Auf Grund dieses Erscheinungsbildes könnte man vermuten, daß die innere Membran plasmatischer Natur sei, wie dies verschiedentlich für Cyanophyceen und auch Bakterien festgestellt wurde (SCANGA 1950, RUHLAND u. HOFFMANN 1925,

METZNER 1955, Lit. siehe DRAWERT 1949). Die innere osmiophile Grenzschicht (Abb. 2 *Gi*) kann durchaus der sogenannten Plasmamembran entsprechen, wie sie neuerdings MURRAY (1957) für ein *Spirillum* (60 Å) und *Bacillus cereus* (25—50 Å) und TOMLIN u. MAY (1955) für *Escherichia coli* (thinner than 100 Å) beschrieben haben, wenn auf Grund noch unbekannter Faktoren eine Art Plasmolyse erfolgt, d. h. das Cytoplasma sich von der Zellwand löst und so sichtbar wird. Diese osmiophile

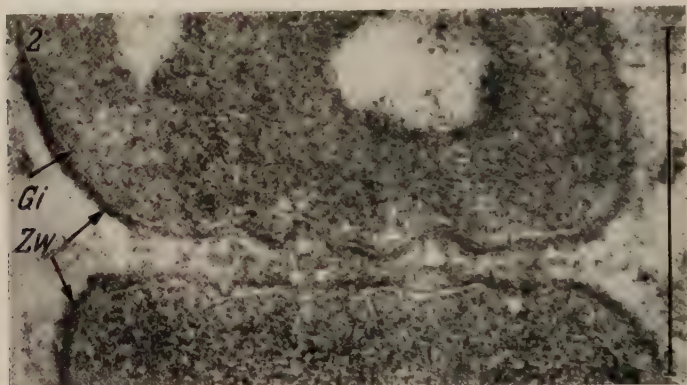


Abb. 2. *Sarcina ventriculi*: Ausschnitt aus dem Bereich der Berührungsstelle zweier Zellen.
Gi innere osmiophile Grenzschicht

Grenzschicht ist im Mittel 35 Å dick. Nach den Untersuchungen von SURINGAR (1865) und SMIT (1930) soll die Zellwand von *Sarcina ventriculi* Cellulose enthalten. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

Das Verhalten der Zellwand während der Zellteilung gleicht dem der Cyanophyceen, insbesondere den Vertretern aus der Familie der *Nostocaceae* (NIKLOWITZ — unveröffentlichte Beobachtung). Das erste sichtbare Zeichen der „Durchschnürung“ der Zellen — denn als solches kann man diesen Vorgang nur bezeichnen —, ist (bis auf die Formveränderungen der Kernäquivalente, wie dies weiter unten noch näher geschildert wird) das Auftreten von sogenannten Höckern an der Zellwand (Abb. 9, rechte Zelle oben). Sie treten stets in der Zweifzahl auf und sind diametral in der Zelle angeordnet. Diese Höcker stellen die Schnittbilder einer Leiste dar, die man sich räumlich als eine die gesamte innere Zellwand umgebende Ringleiste vorzustellen hat. Diese Ringleiste stellt letzten Endes eine Einfaltung der gesamten Zellwand dar, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß die neuen Zellwandelemente am Innenrand des Höckers neu gebildet werden. Ob wir es hier mit einem ähnlichen Vorgang zu tun haben, wie wir dies schon für *Phormidium uncinatum* beschrieben haben (NIKLOWITZ u. DREWS 1956), kann nach dem vorliegenden Untersuchungsmaterial noch nicht entschieden werden. In einem

fortgeschrittenen Stadium der Durchschnürung spaltet die Ringleiste von außen beginnend auf unter gleichzeitiger Verschleimung des Zwischenraumes (Abb. 8). In den zentralen Berührungsstellen der neuen Zellen hingegen bleiben die Zellen noch eine Zeitlang dicht nebeneinander liegen (Abb. 9, rechte Zelle unten).

Cytoplasma

Das Cytoplasma von *S. ventriculi* zeigt auch nach den verschiedensten Fixierungen stets eine globuläre Grundstruktur, in Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren an den verschiedensten Vertretern der Bakterien. Die granulären Körnchen haben eine Größenordnung von 60 Å bis 100 Å und scheinen außerdem in einer noch feiner granulären Grundsubstanz zu liegen (Abb. 2). Das Cytoplasma weist ferner im allgemeinen eine dichte Packung auf (Abb. 1—10). Die granulären Grundstrukturkörnchen weisen demnach eine homogene Verteilung auf und lassen auch an diesem Untersuchungsobjekt Zusammenlagerungen zu größeren cytoplasmatischen Grundstruktureinheiten nicht erkennen (siehe NIKLOWITZ 1958b für *Escherichia coli*). In einigen Fällen konnte eine eigentümliche siebartige Struktur, und zwar in unmittelbarer Nähe der Mitochondrienäquivalente beobachtet werden (Abb. 9 Z). Ob es sich bei den zuletzt beschriebenen Cytoplasmapartien um spezifische Strukturelemente des Cytoplasmas handelt oder ob es jeweilige Bildungen in bestimmten Phasen des Cytoplasmas während des Zellwachstums- und Zellteilungsprozesses sind, muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, vor allem auch deshalb, weil sie relativ selten in Erscheinung treten. Ebenso kann hier noch nicht entschieden werden, ob zwischen den Einzelzellen des Zellpaketes plasmatische Verbindungen in Form von Plasmodesmen vorhanden sind, deren mögliche Existenz man durchaus in Betracht ziehen muß. Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen allerdings scheinen solche Plasmabrücken zwischen den einzelnen Zellen nicht vorhanden zu sein.

Das Cytoplasma, welches fest an der Zellwand haftet, umgibt stets die Bereiche der Kernäquivalente. Über die jeweilige Verteilung und Anordnung des Cytoplasmas während der Zellwachstums- und Zellteilungsprozesse wird im Zusammenhang mit den Beobachtungen der Kernäquivalente hingewiesen.

Mitochondrienäquivalente

Die Mitochondrienäquivalente liegen ausnahmslos der Zellwand dicht an und sind kugelig bis ovoid (Abb. 3—8). Sie besitzen einen mittleren Durchmesser von 250 m μ . Gegen das umliegende Cytoplasma sind sie durch eine osmiophile Grenzschicht abgetrennt (Abb. 4, 6, 7, 8 M). Manchmal hat man den Eindruck, als ob diese osmiophile Grenzschicht doppelt konturiert ist (Abb. 4, 6, 7, 8). Eine definitive Entscheidung muß

den Beobachtungen an Aufnahmegeräten mit höherem Auflösungsvermögen überlassen bleiben (siehe NIKLOWITZ 1958 b).

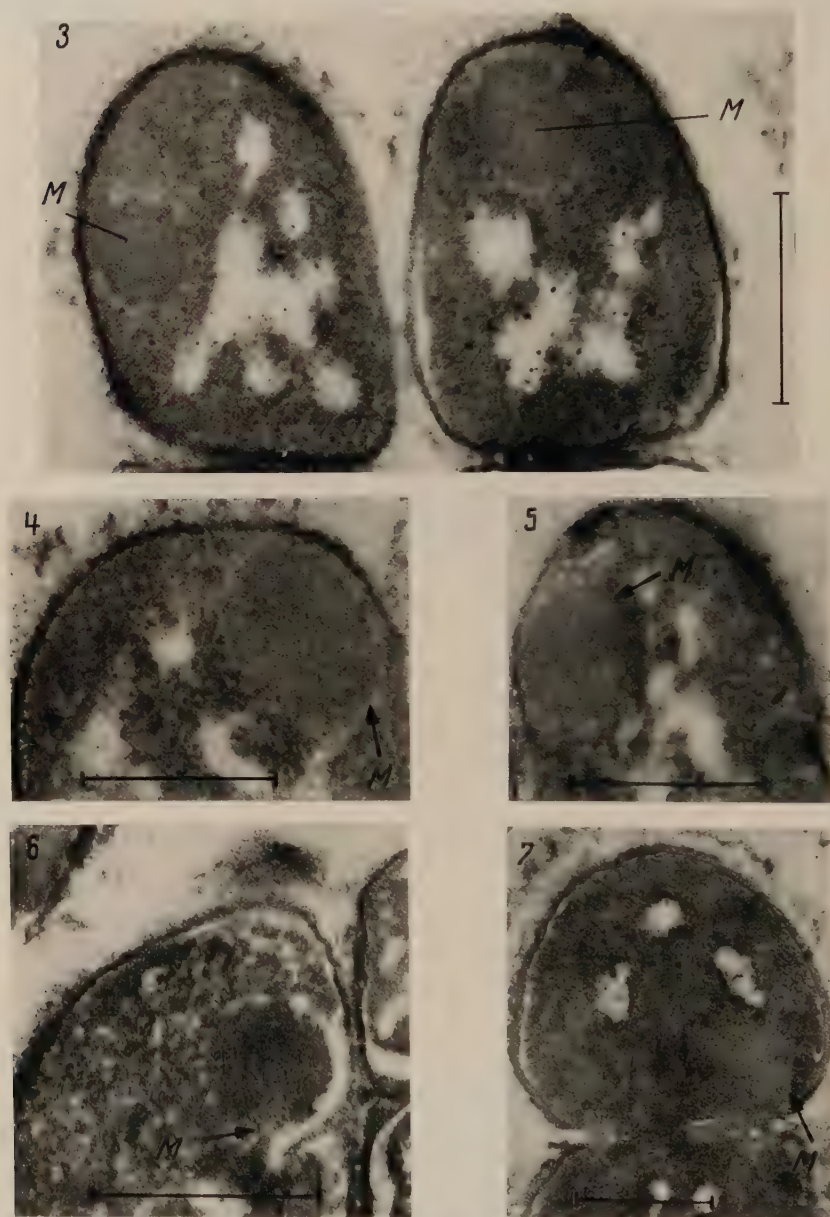


Abb. 3-7. *Sarcina ventriculi*: Zellen und Zellausschnitte mit Mitochondrienäquivalenten (M), die von einer osmiophilen Grenzschicht umgeben sind und lamellenähnliche Strukturierung aufweisen

Im Gegensatz zur Grundstruktur des Cytoplasmas sind die Mitochondrienäquivalente bedeutend feinkörniger granuliert, wobei schwache Andeutungen einer Anordnung der Körnchen zu lamellenähnlichen



Abb. 8. *Sarcina ventriculi*: Zelle in einem bestimmten Teilungsstadium mit diffuser Verteilung der chromatischen Bereiche (K)

Strukturen zu erkennen sind (Abb. 3, 4, 7, 8). Es sind also dieselben Baueigentümlichkeiten, wie wir sie schon für andere Mikroorganismen beschrieben haben.

Interessant ist ferner die Beobachtung, wonach die Mitochondrien-äquivalente auch nach weniger geeigneten Fixierungen als kompakte Gebilde in ihrer Form erhalten bleiben (Abb. 6), was auch aus



Abb. 9. *Sarcina ventriculi*: Schnitt durch eine Zellage eines Zellpaketes, Zellen in verschiedenen Teilungsstadien. Z Grobe netzartig aggregierte Plasmapartien in der Nähe der Mitochondrien (M)

Homogenisationsversuchen bei biochemischen Untersuchungen zu schließen ist. Außerdem sind die Mitochondrienäquivalente in allen Zellwachstums- und Zellteilungsphasen in der beschriebenen Form in

den Zellen vorhanden (Abb. 8, 9). Diese Tatsache schließt eine denkbare Identität dieser Gebilde mit eventuellen Kernen oder Kernäquivalenten aus.

Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Frage der Redox-Orte ergaben nach Verwendung verschiedener Redox-Indikatoren (TTC, Stilben-TC, Janusgrün B) eindeutig die Existenz je eines Redox-Ortes in jeder Zelle, wie es schon McLEAN u. Mitarb. (1955) für *Streptococcus pyogenes* und *Diplococcus pneumoniae* beschrieben haben. Außerdem kann man schon lichtbrechende Granula im Lichtmikroskop (Phasenkontrast) erkennen (Abb. 11). Inwieweit diese Granula mit den weiter oben beschriebenen Mitochondrienäquivalenten identisch sind, oder ob es sich um kondensierte Phosphate (NIKLOWITZ u. DREWS 1955, NIKLOWITZ 1957, DREWS u. NIKLOWITZ 1956, 1957) handelt, kann hier noch nicht entschieden werden. Von grundlegender Bedeutung ist jedenfalls die Beobachtung, daß man im Cytoplasma von *S. ventriculi* am Ultradünnschnitt besondere plasmatische Gebilde feststellen kann, die überwiegend in der Einzahl vorhanden sind. Nach unseren bisherigen Untersuchungsergebnissen sind diese Zellgebilde jenen Zellbestandteilen identisch, wie wir sie schon für *Escherichia coli* als Mitochondrienäquivalente (NIKLOWITZ 1958b) und in Cyanophyceen als „ferment-aktive Granula“ (DREWS u. NIKLOWITZ 1956, 1957) beschrieben haben.

Kernäquivalente

Während das die Kernäquivalentbereiche umgebende Cytoplasma mehr oder weniger kompakt erscheint, manifestiert sich der Bereich der Kernäquivalente selbst als fast elektronenoptisch leerer Raum (Abb. 1, 10) (BIRCH-ANDERSEN u. Mitarb. 1953: Kern-Vacuole). Diese Zellbereiche sind auf Grund obiger Erscheinungen zwar deutlich zu erkennen, doch ist eine signifikante Abgrenzung in Form einer Membran oder Grenzschiicht nicht eindeutig zu beobachten, obwohl man manchmal solches an einigen Stellen vermuten könnte (Abb. 1, 10). Vielmehr kann man jedoch in der Hauptsache eher feststellen, daß die zarten Fäden, die eine lockere, grobmaschige Grundstruktur der Kernäquivalente bilden, sich aus dem Cytoplasma in die Kernäquivalente hinein fortsetzen oder umgekehrt (PREUSSER 1958 „offener Zellkern“). Die Fäden besitzen einen Durchmesser von 35 Å und können die Kernäquivalente kontinuierlich durchsetzen; d. h. sie können von der einen Kernäquivalentseite zur gegenüberliegenden Seite verlaufen. Zur Frage der Natur und Interpretation dieser fädigen Grundstrukturen der Kernäquivalente wird im Zusammenhang mit anderen Beobachtungen des submikroskopischen Feinbaus der Kernäquivalente der Bakterien in einer folgenden Mitteilung berichtet (siehe NIKLOWITZ 1958b). *Soviel können wir jedoch schon nach unseren bisherigen Ergebnissen hier aussagen,*

daß diese Strukturen vorläufig in keiner Weise mit Chromosomen oder chromosomalen Elementen identifiziert werden können.

Von besonderem Interesse ist ferner die Formenvielgestaltigkeit der Kernäquivalente; und zwar gleichen die Formen der feulgenpositiven



Abb. 10. *Sarcina ventriculi*: Zelle unmittelbar vor der Durchschnürung (Teilung).
Kernäquivalentbereiche (K) mit feinsträngiger Grundstruktur

Orte nach der Kernfärbung nach ROBINOW (1949) den Kernäquivalentsformen, wie sie in den Schnitten in Erscheinung treten. Man kommt folglich nicht umhin, festzustellen, daß die Lokalisation der DNS in den oben beschriebenen Bereichen der Kernäquivalente zu sehen ist (BIRCH-ANDERSEN u. Mitarb. 1953, TOMLIN u. MAY 1955, KELLENBERGER u. RYTER 1955, PIEKARSKI u. GIESBRECHT 1956, PIEKARSKI u. PONTIERI 1956, PREUSSER u. Mitarb. 1957 u. a.). Die Bilder wechseln zwischen den beiden extremen Erscheinungsformen, und zwar einmal in der zentralen,

kompakten Lagerung der Kernäquivalente in der Zelle (Abb. 1) und zum anderen in einer diffusen, über die ganze Zelle verteilten Lokalisation der chromatischen Substanzen (Abb. 8, 9). Dazwischen gibt es eine Reihe von Zwischen- und Übergangsformen, die sich entweder als halbmondförmige (Abb. 10), ringförmige (Abb. 1, linke Zelle oben) oder grob-netzförmige Gebilde (Abb. 9) zu erkennen geben. Auf Grund dieser Erscheinung zeigt auch das Cytoplasma zwangsläufig eine unterschiedliche Lagerung und Anordnung.

Das Zustandekommen von *Nucleolusformen* im Kernäquivalent wird auf der Abb. 1 recht anschaulich demonstriert (rechte Zelle oben). Diese Bildungen stellen nichts anderes dar, als die in einer bestimmten Ebene und quer geschnittenen fingerförmigen Fortsätze des Cytoplasmas, die in die Kernäquivalente hineinragen (Abb. 1, linke Zelle oben).

Die Fragen zur Existenz und zum Teilungsmodus der *Coccaceae* sind wiederholt Gegenstand cytomorphologischer Untersuchungen gewesen (zusammenfassende Lit. siehe KNAYSI 1938, 1942, 1944, LEWIS 1941, DELAMATER u. WOODBORN 1952, ROBINOW 1956). Während die Existenz von Kernäquivalenten (PIEKARSKI 1949: Nucleoide, ROBINOW 1956: „Chromatin bodies“) nunmehr eine definitive Tatsache bedeutet, so gibt es doch zwei Richtungen in der Interpretation des Teilungsmodus. Einmal wird eine direkte Teilung propagiert (KNAYSI 1942, ROBINOW 1956, BISSET 1954, BRADFIELD 1954), zum anderen soll dieser Vorgang einer Mitose gleichen (DELAMATER u. WOODBORN 1952, HUNTER 1955). Alle diese Untersuchungen sind bis auf eine Ausnahme (BRADFIELD 1954) lichtmikroskopisch und auch zum Teil elektronenmikroskopisch am Totalpräparat durchgeführt worden. Durch die raschen Fortschritte der Herstellung ultradünner Schnitte, kann eine Klärung dieser Kontroverse erhofft werden, zumal wir an den Schnitten einmal die Kernäquivalente und zum anderen auch die Zellwände gleichzeitig beobachten können (ROBINOW 1956, BISSET 1954). Die große Bedeutung dieser Untersuchungsmethode für den Cytologen wird aus dem Vergleich der Abb. 31 aus RIPPEL-BALDES (1955), der Abb. 11¹ und 1 verständlich, wobei wir bemerken möchten, daß die Aufnahme 11 nach einer Methode gewonnen wurde, wie sie MÜLLER (1956) und MASON u. POWELSON (1956) beschrieben haben.

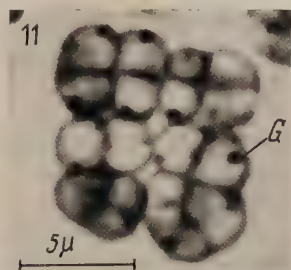


Abb. 11. *Sarcina ventriculi*: 4 Zellpakete mit stärker lichtbrechenden Granula (G). Phasenkontrastaufnahme, Untersuchungsmedium Gelatine n_D 1,385, Aufnahme 850:1, nachvergrößert

¹ Herrn Dr. R. MÜLLER danken wir für die Überlassung der Aufnahme.

Auf Grund unserer Untersuchungen an ultradünnen Schnitten und aus lichtmikroskopischen Vergleichsuntersuchungen können wir zum Zellteilungsmechanismus folgendes aussagen. Aus der Tatsache, daß wir bei unserem Untersuchungsobjekt mit einem relativ schnell wachsenden Organismus zu tun haben und wir folglich in einem Zellpaket die verschiedensten Stadien der Zellteilung vorfinden, besteht die Möglichkeit einer Rekonstruktion der Teilungsstadien innerhalb einer Zelle, soweit unser vorliegendes Untersuchungsmaterial dies gestattet. Zweifelsohne spielt für den Erhaltungszustand der Zelle die Fixierung eine Rolle, wobei auch die physiologischen Zustände stärker in Betracht gezogen werden sollten (NIKLOWITZ 1958a). In unserem Fall müssen wir allerdings die Tatsache in Rechnung ziehen, daß in einem Zellpaket Zellen verschiedenen physiologischen Zustandes vorkommen. Durch die Anwendung einer kombinierten OsO_4 -Formol-Fixierung wird jedoch nahezu derselbe Äquivalentsgrad der Erhaltung der Substruktur in allen Zellen erreicht. Dabei bezeichnen wir die zentrale, mehr oder weniger kompakte Lagerung der chromatischen Substanz als Ausgangsstadium (Abb. 1, rechte Zelle oben) in unseren Betrachtungen. In einem weiteren Stadium setzt nun eine Aufgliederung der Kernäquivalente ein, so daß wir eine Verteilung der DNS-haltigen Bezirke über einen größeren Bereich der Zelle beobachten können (Abb. 8). Im folgenden setzt nun die Einschnürung der Zelle durch die Neubildung der Zellwand ein (Abb. 8, 9, rechte Zelle oben), wie dies für die Zellwand (siehe oben) schon beschrieben wurde. Ist die Durchschnürung der Zelle weiter fortgeschritten oder beendet, dann sammelt sich das chromatische Material zunächst in mehreren größeren und zusammenhängenden Bereichen (Abb. 3, 10), die dann feinsträngiger werden (Abb. 9, rechte Zelle unten, Abb. 9, untere mittlere Zelle) und schließlich wieder in einem zentralen Bereich angeordnet sind.

Ohne hier zur Frage der Existenz von Chromosomen Stellung zu nehmen (siehe GEITLER 1955), scheint die Teilung der Kernäquivalente keiner Mitose zu unterliegen (GEITLER 1957). Vielmehr ist die Annahme einer amitotischen (ROBINOW 1956) oder endomitotischen Teilung (PIEKARSKI u. PONTIERI 1956) sehr wahrscheinlich. Inwieweit wir bei den Bakterien bei der amitotischen Kernäquivalententeilung mit gesetzmäßigen Vorgängen und Abläufen zu tun haben — eine gesetzmäßige Folge gewisser Teilungsschritte muß als logisches Postulat genetischer Untersuchungen gefolgert werden —, die noch cytomorphologisch erfaßbar sind, müssen weitere Untersuchungen ergeben.

Zusammenfassung

An Hand von ultradünnen Schnitten wird über Beobachtungen zum submikroskopischen Feinbau der Gärungssarcine: *Sarcina ventriculi* berichtet.

Eine Hüllsubstanz umgibt Einzelzelle und Zellpaket und enthält amorphe, osmiophile submikroskopische Strukturen.

Die Zellwand ist 30 m μ dick und besteht aus zwei Membranen.

Das Cytoplasma besitzt eine globuläre Grundstruktur, deren Körnchen eine Größe von 60 Å bis 100 Å haben. Es konnten bisher noch nicht beschriebene siebartige Strukturen im Cytoplasma in unmittelbarer Nähe der Mitochondrienäquivalente beobachtet werden.

Im Cytoplasma konnten regelmäßig besondere Gebilde festgestellt werden, die eine lamellenähnliche Strukturierung aufweisen und von einer osmiophilen Grenzschrift vom übrigen Cytoplasma abgegrenzt sind. Diese Gebilde besitzen eine Größenordnung von 250 m μ und stellen die Mitochondrienäquivalente dar.

Die Kernäquivalente zeigen je nach dem Zellteilungsstadium verschiedene Formen und besitzen eine lockere, grobmaschige Grundstruktur, die sich aus fädigen Elementen (Durchmesser 35 Å) aufbaut. Die Erscheinung verschiedener Kernäquivalentformen und die Verteilung der chromatischen Substanz während der Zell- und Kernäquivalentteilung wird diskutiert.

Literatur

BEIJERINCK, M. W.: Een obligaat anaerobe gistingssarcine. Verl. Kon. Akademie v. Wetenschappen, Amsterdam **13**, 608 (1905). — BIRCH-ANDERSEN, A., O. MAALØE and F. S. SJÖSTRAND: High-resolution electron micrographs of sections of *E. coli*. Biochim. biophys. Acta **12**, 395 (1953). — BISSET, K. A.: The cytology of *Micrococcus cryophilus*. J. Bact. **67**, 41 (1954). — BRADFIELD, J. R. G.: Electron microscopic observations on bacterial nuclei. Nature (Lond.) **173**, 184 (1954). — BRINGMANN, G.: Über die elektronenmikroskopischen Feinstrukturen der Membranscheiden von Oscillatorien. Z. wiss. Mikr. **60**, 83 (1951).

CLAUS, D., H. WITTMANN u. A. RIPPPEL-BALDES: Untersuchungen über die Zusammensetzung von Bakterienschleimen und deren Lösungsvermögen gegenüber schwerlöslichen und anorganischen Verbindungen. Arch. f. Mikrobiol. **29**, 169 (1958).

DELAMATER, E. D., and M. WOODBURN: Evidence for the occurrence of mitosis in the micrococci. J. Bact. **64**, 793 (1952). — DRAWERT, H.: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. Planta (Berl.) **37**, 161 (1949). — DREWS, G., u. W. NIKLOWITZ: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. II. Mitteilung. Arch. f. Mikrobiol. **24**, 134 (1956). — Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. III. Mitteilung. Arch. f. Mikrobiol. **25**, 333 (1957).

FREY-WYSSLING, A., u. H. STECHER: Über den Feinbau des Nostoc-Schleimes. Z. Zellforsch. **39**, 515 (1954).

GEITLER, L.: Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Zelle. Fortschr. Bot. **17**, 1 (1955); **19**, 1 (1957). — GOODSIR, J.: History of a case in which a fluid periodically ejected from the stomach, contained vegetable organisms of an undescribed form. Edinburgh Med. a. Surgical Rev. **57**, 430 (1842).

HUNTER, M. E.: Studies of the nucleus of giant cells of *Micrococcus cryophilus*. Exp. Cell. Res. **9**, 221 (1955).

KELLENBERGER, E., et A. RYTER: Contribution à l'étude du noyau bactérien. Schweiz. Z. Path. **18**, 1122 (1955). — KNAYSİ, G.: Cytology of bacteria. Botan. Review **4**, 83 (1938). — The demonstration of a nucleus in the cell of a *Staphylococcus*. J. Bact. **43**, 365 (1942). — Elements of bacterial cytology. New York

1944. — KOCH, G.: Über die Züchtbarkeit und Lebensdauer der *Sarcina ventriculi* in Kulturen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **127**, 604 (1948).

LEWIS, I. M.: The cytology of bacteria. Bact. Rev. **5**, 181 (1941).

MASON, D. J., and D. M. POWELSON: Nuclear division as observed in live bacteria by a new technique. J. Bact. **71**, 474 (1956). — MCLEAN, R. A., St. MUDD and J. C. DAVIS: The differentiation of mitochondria in strains of cocci. J. Bact. **69**, 541 (1955). — METZNER, J.: Zur Chemie und zum submikroskopischen Aufbau der Zellwände, Scheiden und Gallerten von Cyanophyceen. Arch. Mikrobiol. **22**, 45 (1955). — MÜLLER, R.: Zur Verbesserung der Phasenkontrast-Mikroskopie durch Verwendung von Medien optimaler Brechungsindices. Mikroskopie (Wien) **11**, 36 (1956). — MURRAY, R. G. E.: Direct evidence for a cytoplasmic membrane in sectioned bacteria. Canad. J. Microbiol. **3**, 531 (1957).

NIKLOWITZ, W.: Über die Herstellung von Ultradünnschnitten mit einer Uhrmacherdrehbank. Mikroskopie (Wien) **10**, 401 (1955). — Über den Feinbau der Mitochondrien des Schleimpilzes *Badhamia utricularis*. Exp. Cell. Res. **13**, 591 (1957). — Zur Fixierung und Einbettung von Mikroorganismen für die Herstellung ultradünner Schnitte. Naturwissenschaften **45**, 167 (1958a). — Mitochondrien-äquivalente bei *Escherichia coli*. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 1958b (im Druck). — NIKLOWITZ, W., u. G. DREWS: Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Feinstruktur von *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Mikrobiol. **23**, 123 (1955). — Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. I. Mitteilung. Arch. Mikrobiol. **24**, 134 (1956). — Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. IV. Mitteilung. Arch. Mikrobiol. **27**, 150 (1957).

OHRING, H.: Über die *Sarcina ventriculi* und ihre Empfindlichkeit gegen Antibiotika und Chemotherapeutika. Dissertation der Friedrich-Schiller-Universität, Jena 1953.

PFENNIG, N.: Untersuchungen über extracelluläre Schleimsubstanzen von *Streptomyces spec.* Arch. Mikrobiol. **29**, 90 (1958). — PIEKARSKI, G.: V. Zum Problem des Bakterienzellkerns. Ergebn. Hyg. Bakt. **26**, 333 (1949). — PIEKARSKI, G., u. P. GIESBRECHT: Cytologische Untersuchungen an *Bacillus megatherium* mit Hilfe ultradünner Schnitte. Naturwissenschaften **43**, 89 (1956). — PIEKARSKI, G., u. G. M. PONTIERI: Über Feinstrukturen in den kernähnlichen Körpern von *Escherichia coli*. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. **165**, 242 (1956). — PREUSSER, H. J., Fr. W. SCHLOTE u. A. RIPPEL-BALDES: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Verteilung feulgenpositiver Substanz in *Proteus vulgaris*. Naturwissenschaften **44**, 186 (1957). — PREUSSER, H. J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Cytologie von *Proteus vulgaris*. Arch. Mikrobiol. **29**, 17 (1958).

RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1955 (3. Aufl.). — ROBINOW, C. F.: Add. Dubos „Bacterial Cell“. Harvard Univ. Press 1949. — The chromatin bodies of bacteria. Bact. Rev. **20**, 207 (1956). — RUHLAND, W., u. C. HOFFMANN: Die Permeabilität von *Beggiatoa mirabilis*. Planta (Berl.) **1**, 1 (1925).

SCANGA, F.: La Cellula Bacteria. Rendiconti Ist. Sup. Sanita **8**, 1 (1950). — SMIT, J.: Die Gärungssarcinen. Jena: Gustav Fischer 1930. — SURINGAR, W. F. R.: De Sarcine (*Sarcina ventriculi* Goodsir). Leeuwarden 1865.

TOMLIN, S. G., and J. W. MAY: Electron microscopy of sectioned bacteria. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. **33**, 249 (1955).

(Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe)

Polyangium violaceum nov. spec.

Ein Beitrag zur Kenntnis der Myxobakterien*

Von

H. KÜHLWEIN und ESTHER GALLWITZ

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. März 1958)

Die Myxobakterien sind weitverbreitete Bodenorganismen. Häufig gehen sie auf Exkrementen von Pflanzenfressern über und lassen sich davon verhältnismäßig leicht isolieren. Dabei stößt man nicht selten auf unbekannte Arten, aber auch auf Schwierigkeiten bei deren Bestimmung mit den zur Verfügung stehenden Schlüsseln (JAHN 1924, Bergey's Manual 1948). Das hängt wohl damit zusammen, daß die zur Artcharakterisierung hauptsächlich verwendeten morphologischen Merkmale wie Gestalt und Größe der Stäbchenzelle in vegetativem Zustand oder die Form der Fruchtkörper nicht immer konstant genug sind. Andererseits weist BORTELS in einer Diskussionsbemerkung zum Thema Myxobakterien (s. KÜHLWEIN 1952) mit Recht darauf hin, daß man sich auch bei der Zugrundelegung physiologischer Merkmale in der Systematik der Polyangiden mehr Zurückhaltung auferlegen sollte, weil diese bei ein und derselben Art außerordentlich großen Schwankungen unterworfen zu sein scheinen. Man wird daher versuchen müssen, die morphologischen und physiologischen Merkmale zur Bestimmung heranzuziehen, und der Konstanz ihres Auftretens auch unter verschiedenen Bedingungen besondere Aufmerksamkeit zu schenken.

Im folgenden soll über ein *Polyangium* berichtet werden, das in der derzeitigen Systematik nicht aufgeführt ist und als neue Art beschrieben wird (s. a. KÜHLWEIN 1957, KÜHLWEIN u. GALLWITZ noch unveröffentlicht).

Die Gattungsdiagnose für *Polyangium* nach JAHN (1924) ist in Bergey's Manual (1948) für die Familie der *Polyangiaceae* übernommen. Das einzige durchgängig verwertete Merkmal ist dort die Form und Differenzierung des Fruchtkörpers. Nur bei einigen Arten, die nach JAHN beschrieben und in das System aufgenommen wurden (KRZEMIENIEWSKI 1926, 1927, 1930; IMSENECKI 1936; MISHUSTIN 1938), sind auch physiologische Daten angegeben. Interessant ist ferner noch, daß *Polyangium* als die artenreichste Gattung aller Myxobakterien auftritt. Es gelang jedoch nicht, den von uns isolierten Stamm einer dieser Arten zuzuordnen.

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. AUGUST RIPPEL zu seinem 70. Geburtstag.

Polyangium violaceum nov. spec.

Herkunft. Aus Exkrementen einer *Lepus*-Art von Natal/Südafrika. — *Kulturelle Daten.* Die Art wurde zuerst beobachtet, als sich in einer Rohkultur mit ausgelegten Exkrementen auf Fließpapier rötliche Cystenhaufen gebildet hatten. Es gelang, den Stamm durch Waschen reifer Cysten mit 100 IE Penicillin zu reinigen. Die Weiterkultur erfolgte dann abwechselnd auf lebenden Futterbakterien oder auf komplexen Nährböden bestimmter Zusammensetzung.

Vegetatives Stadium. Der Schwarm besteht aus Stäbchen, deren Länge meist zwischen 9 und 12 μ , deren Breite etwa 0,5 μ beträgt. *Fruchtifi-*



Abb. 1. Cysten und Schwarmrand von *Polyangium violaceum* nov. spec. auf *Rhodotorula* spec. (Vergr. 250 $\times$)

kation: Cysten rundlich bis oval, einzeln und zu mehreren, tiefdunkel-violett. Größe der Cysten ziemlich variabel; auf lebendem Futter (*Esch. coli*) schwanken die Maße zwischen 128 und 184 μ (Länge) und 96 und 128 μ (Breite). Sporen länglich, 1,8—3,0 μ /1,2—1,8 μ .

Zur Physiologie von *Polyangium violaceum* nov. spec.

Die morphologischen Merkmale der Stäbchen im Schwarmbereich sowie der Cysten und Sporen in der Fruktifikation hätten kaum ausgereicht, eine neue Art zu benennen. Sie stimmen mit denen von *Polyangium fuscum* (SCHROETER 1886) und dessen Formenkreis (s. BERGEY 1948) mehr oder minder gut überein. Was dennoch zu einer Artabgrenzung berechtigt, ist das auffallende physiologische Verhalten, auf geeigneten Substraten einen typischen violetten Farbstoff zu bilden (nach den Ostwaldschen Farbtafeln, Farbmeßtafel Nr. 2, rot bis violett, ni 8, pl7). Er ist wasserlöslich und aus den oft stark gefärbten Schwarmhäuten extrahierbar. Bei *Polyangium fuscum*, das unserer Art nahe zu stehen scheint, ist ein derartiges Phänomen weder in Stammkulturen noch in

Neuisolierungen, die seit Jahren öfter wiederholt wurden, beobachtet worden. Die Farbstoffbildung ist offensichtlich substratabhängig. Besonders deutlich tritt sie hervor, wenn der Schwarm stark wächst und reichlich Schleim absondert.

Aus Tab.1 geht hervor, daß die Farbstoffbildung auf verschiedenen Substraten mit großer Regelmäßigkeit auftritt und zweifellos weitgehend vom Vorhandensein ausreichender Mengen hochmolekularer N-Verbindungen (Pepton!) im Substrat abhängt. Meist ist sie verknüpft mit starker Schleimproduktion, wodurch sich gerade die Gattung *Polyangium* (KÜHLWEIN 1953) und offenbar auch die Gattung *Podangium* (OETKER 1954) auszuzeichnen scheint (Abb.2, Abb.3). So darf der Schleimhautbildung vegetativer Schwärme beider Gattungen ein diagnostischer Wert zuerkannt werden. Was die Farbstoffbildung betrifft, scheint darauf bisher noch zu wenig geachtet worden zu sein. Jedenfalls ist nichts darüber bekannt, daß eine solche im vegetativen Bereich mit einer gewissen Konstanz auch bei den Arten beobachtet wurde,

Tabelle 1. Abhängigkeit der Farbstoffbildung vom Substrat¹

Nährboden	Farbstoffbildung im vegetativen Stadium	Fruchtifikation	Nährboden	Farbstoffbildung im vegetativen Stadium	Fruchtifikation
Difco-Nähragar	+++	keine	Bakterien-Agar	—	+
Caseinhydrolysat-Agar	+++	keine	Lebendfutter <i>Torula</i>	+++	keine
Peptonhefe-dextrose-Agar	+++	keine	Lebendfutter <i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+
Pepton-Agar	+++	keine	Mistagar	—	keine
Bakt.-Glucose-Pepton-Agar	+++	keine			

¹ Nährsubstratzusammensetzung:

Difco-Nähragar. 2% Bacto-Yeast-Dextrose-Agar, Beef-Extract 3 g/l, Yeast-Extract 1 g/l, Peptone-Extract 5 g/l, Tryptone-Extract 2,5 g/l, Dextrose-Extract 1 g/l, Agar-Extract 15 g/l (alles Bacto).

Casein-Hydrolysat-Agar. 1,5% Fadenagar, 0,5% Casein-Hydrolysat Difco.

Pepton-Hefe-Dextrose-Agar. 2,0% Agar, 0,2% Pepton, 0,2% Hefe, 0,5% Dextrose.

Pepton-Agar. 2,0% Agar, 1,0% Pepton, 1,0% Glucose.

Bakterien-Glucose-Pepton-Agar. 2,0% Agar, 2 Schalen Coli auf 300 cm³ Nährboden, 0,1% Glucose, 0,1% Pepton.

Bakterien-Agar. 2,0% Agar, 2 Schalen Coli auf 300 cm³ Nährboden.

Mistagar. 150 g frischer Rotwildmist + 450 cm³ aqua bidest., keimfrei filtriert (Membranfilter); a) 1 cm³ Dungfiltrat (entspr. 0,25 g Mist), 24 cm³ aqua bidest.; b) 2 cm³ Dungfiltrat (entspr. 0,5 g Mist), 23 cm³ aqua bidest.; c) 5 cm³ Dungfiltrat (entspr. 1,5 g Mist), 20 cm³ aqua bidest.; dazu je 75 cm³ 2%igen Agar.

bei denen schon der Name darauf hindeutet [*Polyangium ferrugineum* (KRZEMIENIEWSKI 1927), *Polyangium luteum* (KRZEMIENIEWSKI 1927)]. Wir möchten annehmen, daß gerade über die Farbstoffbildung eine

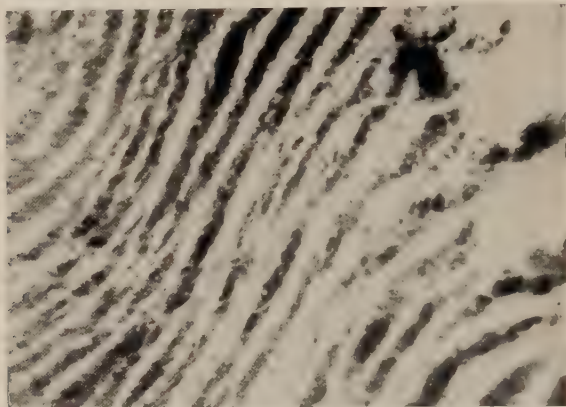


Abb. 2. Lila gefärbte Wälle vom Schwarm von *Polyangium violaceum* nov. spec. auf *Torula* spec. (Vergr. 60×)



Abb. 3. Lila Schleimhaut mit wurmförmigen Cysten von *Polyangium violaceum* nov. spec. auf *Staph. citreus* (Vergr. 250×)

schärfere Artabgrenzung möglich ist. Gewisse Übereinstimmungen mit den Cytophagen sind unverkennbar. Unsere Untersuchungen zur Physiologie der Farbstoffbildung werden z. Z. fortgesetzt.

Die Fähigkeit zum Cellulose-Abbau

Für eine Reihe von *Polyangium*-Arten ist in Bergey's Manual angegeben, daß sie starke Cellulose-Zersetzer sind. Der Name *Polyangium cellulosum* (IMSENECKI u. SOLNTZEVA 1936) deutet direkt darauf hin.

Die Kultur solcher Arten erfolgte offenbar auf Filtrierpapier, das teilweise bis ganz zerstört wurde. In Rohkulturen von *Pol. violaceum* nov. spec. konnten von uns keine Anzeichen einer Cellulosezerstörung beobachtet werden. Nun schien uns der von Speyer (1952) für seine Untersuchungen an *Sporocytophaga myxococcoides* angegebene Präcipitatcellulose-nähragar (PC-Agar) ein Medium zu sein, das evtl. über das cellulolytische Vermögen unseres Stammes eine Aussage zuließ. Die Präcipitatcellulose wurde genau nach der von SPEYER gegebenen Vorschrift hergestellt, und damit Nährböden verschiedener Zusammensetzung beschickt.

1. Präcipitatcellulose-Agar¹,
2. Präcipitatcellulose-Agar mit Zusätzen, 3. Difco-Nähragar mit 0,5% PC und 4. Präcipitatcellulose-Agar mit Pepton.

In dem gleichmäßig milchig trüben Agar kam es in keinem Fall zu so eindeutig klaren Aufhellungszonen, wie sie SPEYER mit *Cytophaga myxococcoides* er-



Abb. 4. *Polyangium violaceum* nov. spec. auf *Saprolegnia*, Kultur 2 Tage alt (Vergr. 60×)



Abb. 5. *Polyangium violaceum* nov. spec. auf *Saprolegnia*, Kultur 4 Tage alt (Vergr. 60×)

¹ Nährsubstratzusammensetzung:

Präcipitat-Cellulose-Agar. 1,5% Agar, 0,5% Präcipitat-Cellulose; pH 7,0.

Präcipitat-Cellulose-Agar mit Zusätzen. 1,0% Agar, 0,5% Präcipitat-Cellulose mit: 1. 0,1% Pepton, 2. 0,1% Asparagin, 3. 0,1% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 4. 0,1% Harnstoff, pH 7,0.

Präcipitat-Cellulose-Agar und Difco-Nährboden. 1% Difco (Bacto-Yeast-Dextrose-Agar). Präcipitat-Cellulose 0,5 g auf 100 cm³ (bezogen auf Trockensubstanz).

Präcipitat-Cellulose-Agar mit Pepton. 1,5% Agar, 1,0% Pepton, 0,5% Präcipitat-Cellulose; pH 7,0.

halten hat. Wir haben auf der Suche nach einem anderen geeigneten Cellulose-Test *Saprolegnia*-Hyphen verwendet, von deren Zellwänden angegeben wird, daß sie aus Cellulose bestehen. Das *Saprolegnia*-Mycel wurde von Agarreinkulturen abgeschwemmt, gewaschen, hitzesterilisiert und als einzige Nährstoffquelle unserem *Polyangium*-Stamm angeboten. Das Ergebnis war insofern überraschend, als sich

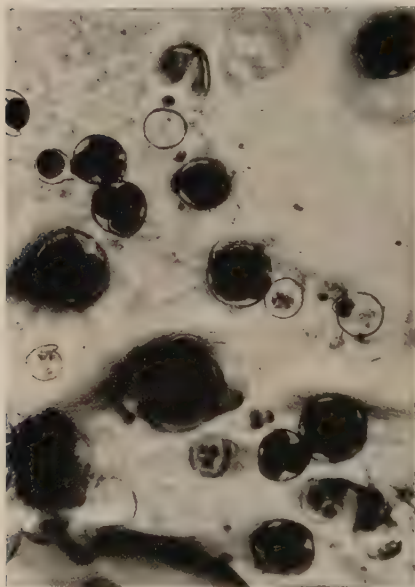


Abb. 6. *Polyangium violaceum* nov. spec. auf *Saprolegnia*, Kultur 6 Tage alt (Vergr. 60×)

zeigte, daß innerhalb kürzester Zeit die so behandelten *Saprolegnia*-Hyphen von einem dichten Stäbchenschwarm umgeben waren und anschließend restlos zersetzt worden sind. Ein besonders interessantes Phänomen ließ sich dabei beobachten. Die *Saprolegnia*-Oogonien sind gegenüber dem enzymatischen Angriff der Bakterien völlig resistent. Wenn die Hyphen des Pilzes aufgezehrt waren, lagen die Oogonien noch unverändert im Schwarmbereich von *Polyangium* (siehe Abb. 4—6). Die Zellwände von *Saprolegnia* müssen also im Laufe der Oogonese stofflich verändert, vielleicht mit einem Material inkrustiert werden, das sie besonders resistent gegenüber enzymatischen Angriffen macht, und

was biologisch durchaus verständlich erscheint. Dieser Tatbestand wirft aber die prinzipielle Frage auf, ob für *Polyangium violaceum* auf Grund der oben mitgeteilten Versuchsergebnisse hinreichend bewiesen ist, daß eine Aktivität gegenüber Cellulose besteht. Auch wenn man unterstellt, daß das rasche und üppige Wachstum von *P. violaceum* mit *Saprolegnia*-Hyphen als Futter durch Inhaltsstoffe der Hyphen zusätzlich gefördert wird, ist doch erwiesen, daß die Zellwände der Hyphen restlos zerstört werden und offenbar als C-Quelle dienen. Unter der Voraussetzung, daß die *Saprolegnia*-Hyphen wirklich aus nativer Cellulose bestehen — vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zellwand- und Oogonienhüllenmaterial sind im Gange — und *P. violaceum* nov. spec. diese abzubauen vermochte, schien es weiter von Interesse, zu prüfen, wie andere Myxobakterienstämme sich *Saprolegnia* gegenüber verhalten¹. Soweit sich bis jetzt übersehen läßt, verfügten auch

¹ Siehe auch E. M. NOLTE, Arch. Mikrobiol. 1957.

Chondromyces spec. und die Myxococcaceen *Myxococcus virescens* und *Myxococcus rubescens* über die Fähigkeit, das Hyphenmaterial anzugreifen und zu zerstören. Wenn verschiedentlich in der Literatur darauf hingewiesen wird, daß Myxobakterien auf anderen Mikroorganismen zu wachsen und Fruchtkörper zu bilden vermögen, geht daraus nicht klar hervor, inwieweit sich die Aktivität auch gegen das Zellwandmaterial richtet. Es scheint in vielen Fällen so zu sein, daß schon durch Veränderung der Permeabilitätsverhältnisse Nährstoffgefälle geschaffen werden, die eine gewisse Entwicklung der Myxobakterien auf den betreffenden Partnern durchaus verständlich werden lassen. Um einen wirklichen enzymatischen Abbau von Zellwandmaterial kann es sich natürlich nur dort handeln, wo eine echte Lyse sichtbar wird. Das gilt für viele Bakterienzellwände, für gewisse Hefen und sehr eindrucksvoll für *Saprolegnia*. Das Zellwandmaterial von Ascomyceten und Basidiomyceten ist, soweit unsere bisherigen Untersuchungen eine solche Aussage zulassen, weitgehend resistent. Auch die Hüllen encystierter Amöben, sowie die Sporenwände von Myxomyceten werden nicht angegriffen.

Zusammenfassung

Polyangium violaceum nov. spec., aus Exkrementen einer *Lepus*-Art von Natal/Südafrika isoliert, wird beschrieben. Es unterscheidet sich von den bisher bekannten *Polyangium*-Arten hauptsächlich durch Produktion eines lila Farbstoffes in den Cystenhüllen sowie in den Schleimhäuten. Der Farbstoff ist wasserlöslich. Die physiologischen Bedingungen, unter denen er gebildet wird, werden erörtert, und die Fähigkeit des Organismus zum Celluloseabbau wird diskutiert.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore 1948. — IMSENECKI, A., u. L. J. SOLNTZEVA: Academia Nauk, Leningrad, Izvestia. 1115 (1936); zit. nach BERGEY. — JAHN, E.: Beiträge zur botanischen Protistologie. 1. Die Polyangiden. Leipzig 1924. — KRZEMIENIEWSKI, H. u. S.: Zur Morphologie der Myxobakterienzelle. Acta Soc. Bot. Poloniae 4, 1 (1926). — Über die Verbreitung der Myxobakterien. Acta Soc. Bot. Poloniae 5, 97 (1927). — Die Myxobakterien von Polen. Acta Soc. Bot. Poloniae 7, 253 (1930). — KÜHLWEIN, H.: Neue Untersuchungen über Myxobakterien. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 158, 346 (1952). — Weitere Untersuchungen an Myxobakterien. Arch. Mikrobiol. 19, 365 (1953). — Untersuchungen über die Bewegung der Myxobakterien. Ber. dtsh. bot. Ges. LXX, 6, 227 (1957). — KÜHLWEIN, H., u. E. GALLWITZ: Über neue Myxobakterien (noch unveröffentlicht). — MISHUSTIN, E. N.: Mikrobiologija 7, 427 (1938); zit. nach BERGEY. — NOLTE, E. M.: Untersuchungen über Ernährung u. Fruchtkörperbildung von Myxobakterien. Arch. Mikrobiol. 28, 291 (1957). — OETKER, H.: Untersuchungen über die Ernährung einiger Myxobakterien. Arch. Mikrobiol. 19, 206 (1953). — SPEYER, E.: Untersuchungen an Sporocytophaga myxococcoides. Arch. Mikrobiol. 18, 245 (1953).

(From the Department of Bacteriology, University of California, Berkeley, Calif.)

Studies on the Role of Carotenoid Pigments in a Chemoheterotrophic Bacterium, *Corynebacterium poinsettiae**

By

RIYO KUNISAWA and R. Y. STANIER

With 4 Figures in the text

(Eingegangen am 27. Mai 1958)

Carotenoid pigments are synthesized by all phototrophs and by many chemotrophic fungi and bacteria. In phototrophs, these pigments are invariably present in the photosynthetic apparatus, and often participate effectively in light absorption for photosynthesis (see BLINKS 1954). The elegant studies of DUYSSENS (1952) on fluorescence emission spectra of algae and purple bacteria have shown that radiant energy absorbed by carotenoids is directly transferred to chlorophyll. Thus in many, if not all phototrophs, the carotenoid pigments of the photosynthetic apparatus act as ancillary light absorbers, which effectively trap radiant energy in spectral regions where chlorophyll itself absorbs weakly.

Studies in our laboratory on a mutant of the purple bacterium, *Rhodospseudomonas spheroides* (GRIFFITHS, SISTROM, COHEN-BAZIRE and STANIER 1955; SISTROM, GRIFFITHS and STANIER 1956; DWORKIN 1958) suggest that the carotenoids of the photosynthetic apparatus may have a second, distinct physiological function, which could well be more universal and more important to the economy of the cell than their function in energy transfer: namely, protection of the cell from the damaging effects of photo-oxidation. The mutant in question, the so-called blue-green mutant, forms no colored carotenoids; their place in the photosynthetic apparatus is taken by a colorless, highly saturated precursor, the C₄₀ polyene phytoene (GRIFFITHS and STANIER 1956). The mutant can still synthesize bacteriochlorophyll, and can grow photosynthetically under the strictly anaerobic conditions which are normal for the bacterial photosynthesis. However, cells so grown are disastrously affected by simultaneous exposure to light and air: they are rapidly killed, and their chlorophyll is destroyed. The wild type of *R. spheroides*, and other mutant phenotypes in which the normal carotenoids have been replaced by precursor pigments which are still colored, do not manifest this extreme aerobic photosensitivity. Several lines of evidence

* Herrn Prof. Dr. A. RIPPPEL zum 70. Geburtstag gewidmet.

establish that the photosensitizing pigment in the blue-green mutant is the intracellular bacteriochlorophyll. Since the bacteriochlorophyll of the mutant is chemically indistinguishable from that of the wild type, and still effective for photosynthesis, it seems evident that the replacement of colored carotenoids by phytoene in some way permits the bacteriochlorophyll to catalyze photo-oxidations which are normally held in check or prevented. Accordingly, we have proposed the hypothesis that the carotenoid pigments associated with the photosynthetic apparatus act as buffers against chlorophyll-catalyzed photo-oxidations.

Subsequent observations on two other purple bacteria, *Rhodospirillum rubrum* (COHEN-BAZIRE and STANIER 1958) and *Chromatium* (FULLER and ANDERSON 1958), strengthen this hypothesis. Synthesis of colored carotenoids in these two purple bacteria can be specifically inhibited by diphenylamine; the specific inhibition is freely reversible, normal carotenoid synthesis being resumed as soon as the inhibitor is removed. Cells of *R. rubrum* depleted of carotenoid pigments by photosynthetic growth in the presence of diphenylamine show the characteristic manifestations of aerobic photosensitivity which had been observed previously in the blue-green mutant of *R. spheroides*. Furthermore, the photosensitivity induced in *R. rubrum* by growth with diphenylamine rapidly diminishes when normal carotenoid synthesis is resumed, after removal of the inhibitor (COHEN-BAZIRE and STANIER 1958). In *Chromatium*, the phenomenon of diphenylamine-induced aerobic photosensitivity has been demonstrated on a sub-cellular level. In carotenoid-depleted chromatophores, prepared from cells grown in the presence of diphenylamine, photophosphorylative ability is rapidly and completely destroyed by brief simultaneous exposure to light and air; in normal chromatophores, photophosphorylative ability is far less sensitive to the combined effects of light and air (FULLER and ANDERSON 1958). There are indications that carotenoid pigments can also protect against photo-oxidative damage in oxygen-evolving phototrophs. Suggestive evidence has been obtained from studies of carotenoid-deficient mutants of *Chlorella* (KANDLER and SCHÖTZ 1956), *Zea mays* (KOSKI and SMITH 1951) and *Helianthus annuus* (WALLACE and SCHWARTING 1954).

In view of the findings which have just been described, it seemed possible that the carotenoid pigments characteristically synthesized by many non-photosynthetic bacteria and fungi might perform a similar function in these organisms. Here, of course, the possibility of photo-oxidative damage by chlorophylls does not exist; but chemotrophic organisms do contain pigments (e. g., porphyrin derivatives, flavins) with the intrinsic ability to catalyze photo-oxidations, which might sensitize the cell to visible light. Thus a system capable of minimizing photo-oxidative damage could well be of biological value to those

chemotrophs which encounter intense or prolonged solar exposure under aerobic conditions in nature. The bactericidal effect of sunlight is commonly attributed to absorption of the ultra-violet portion of the solar spectrum by proteins and nucleic acids. However, SWART-FÜCHTBAUER and RIPPEL-BALDES (1951) have shown that sunlight of the spectral region between 366 and 405 $m\mu$ is markedly bactericidal; obviously, this effect cannot be caused by light absorption by nucleic acids or proteins, and is most plausibly ascribed to pigment-sensitized photo-oxidations. Many of the facts about the distribution and synthesis of carotenoids in non-photosynthetic bacteria and fungi are compatible with the hypothesis that these pigments could play a protective role against damage by light (STANIER and COHEN-BAZIRE 1957); but direct experimental evidence has heretofore been wholly lacking. Accordingly, we decided to investigate the problem of carotenoid function in a typical chemoheterotrophic bacterium, *Corynebacterium poinsettiae*.

Methods

A. Media and methods of cultivation

Medium A, used for the maintenance of stock cultures and for plating purposes, has the following composition: yeast extract (Difco) 0.3%; casamino acids, technical grade (Difco) 0.2%; K_2HPO_4/NaH_2PO_4 , pH 6.8, 0.005 M; concentrated mineral base (COHEN-BAZIRE *et al.*, 1957), 5 ml/L; agar, 1.5%. Medium B, used for the growth of liquid cultures, has the following composition: glucose, 0.2%; yeast extract (Difco), 0.1%; casamino acids, technical grade (Difco), 0.1%; $(NH_4)_2SO_4$, 0.1%; Na citrate, 0.01%; $MgSO_4$, 0.01%; K_2HPO_4/NaH_2PO_4 , pH 7.2, 0.1 M. The glucose was sterilized separately from the other constituents, as a concentrated aqueous solution, the requisite amount being added aseptically to the sterilized and cooled medium.

Cell density was determined by measurement of optical density at 700 $m\mu$, using a Beckman model DU spectrophotometer. At this wavelength, there is no light absorption by cellular pigments. The relationship between bacterial concentration and optical density is linear up to an optical density of 0.120; more concentrated suspensions were diluted appropriately with water before density determinations were made. An optical density of 0.100 at 700 $m\mu$ corresponds to a bacterial concentration of approximately 5×10^8 cells/ml, or a dry weight of 0.2 mg./ml.

Liquid cultures for the measurement of growth rates and for the preparation of cells for photokilling experiments were grown at 30° C. in a shaking water bath; Erlenmeyer flasks with a capacity of 1 L, containing 150–250 ml of medium B were employed. Mass liquid cultures, used to obtain the quantities of cells needed for extraction and determination of pigments, were grown in carboys of 20 L capacity, each containing 10 L of medium B. The carboys were kept in a constant temperature room (30° C), and continuously sparged with compressed air. With a 10% inoculum, such cultures gave a cell yield of approximately 0.85 g (dry weight) per liter after 18 hours of growth.

Carotenoid-depleted cells of the pigmented parent strain were prepared by growth in shaken flasks of medium B containing diphenylamine at a final concentration of 10^{-4} M. The diphenylamine was dissolved in 95% ethanol, and the requisite quantity of this alcoholic solution was added without sterilization to the sterilized culture medium. Control experiments showed that the quantity of ethanol so introduced was without effect on bacterial growth.

B. Procedure for photokilling experiments

Cells were harvested by centrifugation from liquid cultures in the exponential phase of growth, and resuspended in Hutner phosphate buffer (JENSEN, COHEN-BAZIRE, NAKAYAMA and STANIER 1958), pH 7.8. The suspension was diluted with the same buffer to a cell density of approximately 2×10^6 ml, and aliquots were placed in large test tubes (30×200 cm), closed with rubber stoppers bearing a sampling tube and gas inlet and outlet tubes. The tubes were placed in a glass water bath maintained at 30°C ., at a distance of 2.5 cm. from the entrance window. They were continuously aerated with either 95% air-5% CO_2 or 95% N_2 -5% CO_2 . Dark controls were completely wrapped with aluminium foil. At the start of an experiment, toluidine blue was added to each tube at a final concentration of 3×10^{-6} M, and illumination was started. In most experiments, the light source consisted of two 300 W reflector flood lamps, so arranged as to give a light intensity of 1000 f.-c. at the surface of the entrance window. In the experiments with carotenoid-depleted cells obtained by growth in the presence of diphenylamine, a battery of 60 W Lumiline bulbs was used as the light source, and arranged to give a light intensity of 1200 f.-c. at the surface of the entrance window. The entrance window was covered by a glass Corning filter (No. 3484) which transmits only wavelengths longer than $507\text{ m}\mu$, in order to prevent the photodecomposition of any residual diphenylamine which might have been present in the cells.

Photokilling was determined by the measurement of viable counts on samples withdrawn immediately before the start of illumination, and at subsequent intervals up to 2 hrs. The dilution and plating of the samples were conducted in a semi-darkened room; the maximal light intensity in the working area was 3 f.-c.

C. Extraction and determination of carotenoids

It proved very difficult to obtain a complete extraction of the carotenoids from *C. poinsettiae*. The final procedure adopted, which proved fairly satisfactory, was the following. Cells were collected by centrifugation and resuspended in a small volume of water, to which was added an equal volume of methanol. The mixture was stored in the dark at room temperature for 4 days. The cells were then collected by filtration and ground with 2—3 times their weight of levigated alumina. The mixture of ground cells and alumina was then repeatedly extracted with absolute methanol, the grinding process being repeated after each removal of solvent. The combined methanol extracts were placed in a separatory funnel with petroleum ether, and the carotenoids were transferred to the petroleum ether phase by addition of water. After addition of KOH, the aqueous phase was twice re-extracted with petroleum ether. The combined petroleum ether extracts were washed with water and dried over Na_2SO_4 .

The carotenoids extracted from pigmented cells of the parent strain were chromatographed in petroleum ether on a column of WOELM neutral aluminium oxide, activity grade 2. The column was developed successively with pure petroleum ether, diethylether-petroleum ether mixtures, and acetone-petroleum ether mixtures. The same procedure was used for separating the carotenoids extracted from cells of the parent strain grown with diphenylamine. The colorless carotenoids extracted from the mutant strain were chromatographed in petroleum ether on a column of WOELM basic aluminium oxide, activity grade 1, and the column was developed successively with pure petroleum ether and diethyl ether-petroleum ether mixtures.

The carotenoids eluted from the columns were identified and estimated quantitatively from their absorption spectra, using the extinction coefficients listed in table 1.

Table 1. *Absorption data for the principal carotenoids found in C. poinsettiae*

Compound	Position of main peak in petroleum ether $m\mu$	Extinction, $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$	Reference
Phytoene	285	850	RABOURN, QUACKENBUSH and PORTER 1954
Phytofluene	347	1500	PORTER and LINCOLN 1950
Cryptoxanthin	450	2500	STARR and SAPERSTEIN 1953
Lycoxanthin	472	3460	GOODWIN and LAND 1956
Spirilloxanthin	492	2350	POLGAR, VAN NIEL and ZECHMEISTER 1944

The petroleum ether (b. p. 30—60° C.) used throughout this work was purified by passage through a silica column, which effectively removes aromatic contaminants that interfere with spectral measurements of phytoene and phytofluene.

Results

A. Preparation of the biological material

The test organism selected was the phytopathogenic bacterium, *Corynebacterium poinsettiae*. Previous studies (STARR and SAPERSTEIN 1953) had shown that this bacterium synthesizes a mixture of three carotenoid pigments: lycoxanthin, cryptoxanthin and spirilloxanthin. Strain *CP 2*, investigated by these workers, was obtained through the kindness of Dr. M. P. STARR. It was first necessary to obtain populations identical so far as possible with the original strain, except that they did not contain colored carotenoids. This was achieved in two different ways: by the isolation of a colorless mutant, and by growth in the presence of diphenylamine.

1. Isolation and properties of a colorless mutant

Strain *CP 2* was first marked genetically with streptomycin resistance, in order to facilitate the recognition of possible colorless mutants. By use of the gradient plate technique (SZYBALSKI 1954), a mutant capable of good growth at a streptomycin level of 1 mg/ml (strain *CP 2 S^r*) was obtained from strain *CP 2*, which is inhibited at a streptomycin level of 100 μ g/ml. Strain *CP 2 S^r* was then exposed to a dose of ultraviolet irradiation sufficient to kill 99.9 per cent of the population. The survivors yielded on plating one colorless colony, from which a stable colorless strain, *CP 2 S^rW*, was obtained after several replatings. It was morphologically indistinguishable from strain *CP 2 S^r*, and showed the same level of streptomycin resistance. The growth rates of the two strains in medium *B* were identical.

2. Suppression of carotenoid synthesis in strain CP 2 S^r by diphenylamine

Preliminary experiments showed that strain *CP 2 S^r* could grow in medium *B* containing 10^{-4} M diphenylamine at a rate almost equal to

that in the absence of diphenylamine, and that the diphenylamine-grown cells were virtually devoid of colored carotenoids, as judged by visual observation.

3. Quantitative comparison of carotenoid composition of pigmented and colorless cells

As shown in table 2, strain *CP 2 S^r* contains a mixture of the three carotenoid pigments previously reported by STARR and SAPERSTEIN (1953) to be produced by *C. poinsettiae*. Grown in the presence of diphenylamine, the same strain produces predominantly phytoene, accompanied by much smaller amounts of phytofluene and traces of unidentified colored carotenoids. The colorless mutant, strain *CP 2 S^rW*, synthesizes predominantly phytoene, together with traces of phytofluene.

Table 2. Carotenoid content of pigmented and non-pigmented cells of *C. poinsettiae*

Compound	μg. of compound per g. dry weight of cells		
	<i>CP 2 S^r</i> normal cells	<i>CP 2 S^r</i> grown with diphenylamine	<i>CP 2 S^rW</i>
Phytoene		88.3	309.0
Phytofluene		5.3	1.4
Cryptoxanthin	67.7		
Lycioxanthin	106.4		
Spirilloxanthin	42.0		
Unidentified colored carotenoids		ca. 2.5	

B. Studies on sensitivity to visible light

1. Comparative studies of *CP 2 S^r* and *CP 2 S^rW*

Initial attempts to demonstrate aerobic sensitivity to visible light in the absence of an exogenous sensitizing dye were unsuccessful. No decline in the viable count of either strain was apparent after aerobic exposure to a light intensity of approximately 4000 f.-c. for 4 hours. Further comparative studies were therefore conducted in the presence of a low concentration of a photosensitizing dye, toluidine blue. These experiments revealed a dramatic difference in photosensitivity between strains *CP 2 S^r* and *CP 2 S^rW*.

As shown in fig. 1, aerobic exposure of strain *CP 2 S^r* to a light intensity of approximately 1000 f.-c. for 2 hours in the presence of 3×10^{-6} M toluidine blue has no significant effect on viable count; under identical conditions, the viable count of strain *CP 2 S^rW* falls by a factor of 10^4 . On plates prepared from populations of *CP 2 S^rW* exposed to light for 30 minutes or more, numerous small colonies appear. These colonies

eventually attain a normal size upon prolonged incubation, and evidently represent the progeny of cells which have sustained sublethal photochemical damage. A similar phenomenon has been observed in the dye-sensitized photokilling of *Serratia marcescens* (KAPLAN 1956) and the chlorophyll-sensitized photokilling of the blue-green mutant of *R. sphaeroides* (DWORKIN 1958). Fig. 1 also

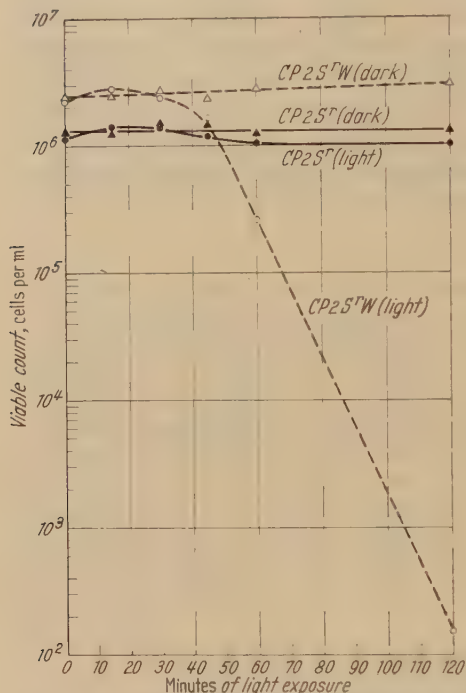


Fig. 1. A comparison of the effects of visible light on dye-sensitized cells of strains *CP2S^r* and *CP2S^rW*. Data for dark controls are also included

shows that no decline of the viable count of *CP2S^rW* occurs in a dark control suspension. It therefore follows that the observed death in the light is photochemical, and is not attributable to toxicity of the added dye. Dye-sensitized photokilling of *CP2S^rW* is entirely prevented by maintenance of anaerobiosis during illumination (fig. 2).

In a dye-catalyzed photo-oxidation, biological damage is caused primarily by dye molecules in intimate contact with the cell. Practically speaking, therefore, the dye molecules effective in photokilling are those absorbed by the cell, and not those distributed through the surrounding solvent. Hence the different susceptibilities of strains *CP2S^r* and *CP2S^rW* to dye-sensitized photokilling could conceivably reflect a

difference in the absorptive capacities of the cells for toluidine blue, rather than a difference in intrinsic photosensitivity. Accordingly, the absorptive capacities of the two strains for toluidine blue were determined. Liquid cultures in the exponential phase of growth were harvested at optical densities of approximately 0.500, and 10 ml. aliquots were centrifuged. The supernatant liquid was discarded, and the bacterial pellets were resuspended in 10 ml. of Hutner phosphate buffer (pH 7.8), containing 6×10^{-5} M toluidine blue. After incubation in the dark at room temperature for one hour, the suspensions were recentrifuged, and the amount of dye absorbed by the cells was determined by comparing the amount of toluidine blue remaining in the supernatant liquid with the amount originally present in the solution used to suspend the bacteria.

Toluidine blue was estimated by light absorption at $615\text{ m}\mu$, the maximum in the visible region. The results of this experiment (table 3) show that the absorptive capacities of the two strains for toluidine blue are identical, within the limits of experimental error. The differing sensitivities of strains *CP 2 S^r* and *CP 2 S^rW* to photokilling cannot, therefore, be ascribed to a difference in the effectiveness with which they absorb the sensitizing dye.

It seemed possible that the marked sensitivity of *CP 2 S^rW* to dye-catalyzed photo-oxidation might be a manifestation of a generally increased sensitivity to radiation damage. In order to test this point the rates of killing of strains *CP 2 S^r* and *CP 2 S^rW* by ultraviolet light were compared. As shown in table 4 the sensitivities of these two strains to ultraviolet irradiation do not differ measurably. The increased sensitivity of strain *CP 2 S^rW* to visible light is therefore specific.

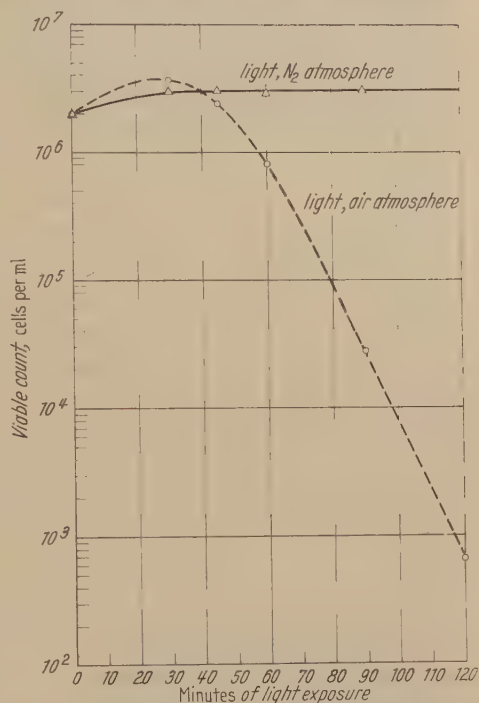


Fig. 2. Protective effect of anaerobiosis against dye-sensitized photokilling of strain *CP2S^rW*

Table 3. Absorptive capacities of strains *CP2S^r* and *CP2S^rW* for toluidine blue at pH 7.8

Strain	Density units of bacteria*	Density units of toluidine blue**			Units of dye absorbed per unit of bacteria
		1 Added to bacteria	2 Unabsorbed by bacteria	3 Absorbed by bacteria (1-2)	
<i>CP2S^r</i>	5.07	7.72	4.92	2.30	0.455
<i>CP2S^rW</i>	4.83	7.72	5.14	2.08	0.432

* Optical density of suspension at $700\text{ m}\mu$, multiplied by volume of suspension in milliliters.

** Optical density of solution at $615\text{ m}\mu$, multiplied by volume of solution in milliliters.

2. Effect of visible light on carotenoid-depleted cells of strain *CP 2 S^r*

As already described, the synthesis of colored carotenoids by strain *CP 2 S^r* can be almost wholly suppressed by growth in the presence of diphenylamine. Such carotenoid-depleted cells show a high degree of aerobic photosensitivity in the presence of toluidine blue (fig.3). It is evident that the loss of colored carotenoids occasioned by growth in the presence of diphenylamine confers a degree of sensitivity to dye-catalyzed photo-oxidation that is comparable to the sensitivity of the colorless mutant.

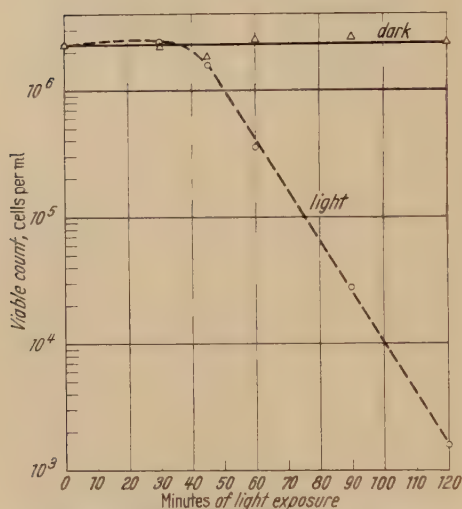


Fig. 3. Dye-sensitized photokilling of strain *CP2S^r*, depleted of carotenoid pigments by growth in the presence of diphenylamine. Data for dark control also included

Table 4. Sensitivities of strains *CP2S^r* and *CP2S^rW* to ultraviolet irradiation

Exposure time, minutes	Per cent survival	
	<i>CP2S^r</i>	<i>CP2S^rW</i>
1	48.6	50.7
2	8.0	8.5
3	0.25	0.22

Discussion

The experiments which are described here show conclusively that in *Corynebacterium poinsettiae* the elimination of colored carotenoids from the cell results in an enormously increased sensitivity to visible light.

This occurs whether colored carotenoids are eliminated genetically, by mutation, or physiologically, by growth in the presence of diphenylamine, a specific inhibitor of colored carotenoid formation. The development of photosensitivity following the physiological suppression of carotenoid formation is particularly convincing evidence for a causal relationship between the two phenomena, since the sensitive and resistant cells have identical genetic backgrounds.

The sensitivity of carotenoid-depleted cells to visible light could be demonstrated only in the presence of an exogenous photosensitizing dye, toluidine blue. Evidently the cells do not contain sufficient amounts of natural photosensitizing pigments to manifest endogenous photosensitization under the most severe conditions of light exposure that were tested (approximately 4000 f.-c. for 4 hours). Hence the ecological significance of our findings is questionable. While it is impossible to assess accurately

the intensity of solar radiation to which *C. poinsettiae* might be exposed in nature, we have no experimental grounds for believing that the observed photosensitivity which accompanies the loss of colored carotenoids would prove biologically deleterious under natural conditions. Only further studies of a similar kind on a variety of carotenoid-containing chemoheterotrophic bacteria and fungi will permit a definitive evaluation of the ecological importance of carotenoid pigments in these organisms as protective agents against photochemical damage.

Summary

The hypothesis that colored carotenoids can protect chemoheterotrophic microorganisms from damage by visible light has been investigated.

Corynebacterium poinsettiae, a bacterium that forms the three carotenoid pigments lycoxanthin, cryptoxanthin and spirilloxanthin, was used as test organism. Non-pigmented cells, in which the normal carotenoids were largely replaced by the colorless C₄₀ polyene, phytoene, were obtained by two methods: isolation of a mutant with a block in carotenoid synthesis; and cultivation of the parent strain in the presence of diphenylamine, a specific chemical inhibitor of carotenoid synthesis.

Comparative studies of the effects of visible light on dye-sensitized pigmented and non-pigmented cells showed that non-pigmented cells can be rapidly killed by exposures which are without effect on pigmented cells. Both physiological and genetic suppression of pigment synthesis produce photosensitivity. The non-pigmented mutant is killed by ultraviolet light at the same rate as the pigmented parent strain, indicating that the acquired photosensitivity of the former is specific for visible light.

Acknowledgements. This work was supported by a grant from the National Science Foundation.

References

- BLINKS, L. R.: Autotrophic Microorganisms, Fourth Symp. Soc. Gen. Microbiol. 224 (1954).
 COHEN-BAZIRE, G., W. R. SISTROM and R. Y. STANIER: J. cell. comp. Physiol. 49, 25 (1957). — COHEN-BAZIRE, G., and R. Y. STANIER: Nature (Lond.) 181, 250 (1958).
 DUYSSENS, L. N. M.: Dissertation. Utrecht 1952. — DWORKIN, M.: J. gen. Physiol., in press.
 FULLER, R. C., and I. C. ANDERSON: Nature (Lond.) 181, 250 (1958).
 GOODWIN, T. W., and D. E. LAND: Arch. Mikrobiol. 24, 305 (1956). — GRIFFITHS, M., W. R. SISTROM, G. COHEN-BAZIRE and R. Y. STANIER: Nature (Lond.) 176, 1211 (1955). — GRIFFITHS, M., and R. Y. STANIER: J. gen. Microbiol. 14, 698 (1956).

JENSEN, S. L., G. COHEN-BAZIRE, T. O. M. NAKAYAMA and R. Y. STANIER: *Biochim. biophys. Acta*, in press.

KANDLER, O., und F. SCHÖTZ: *Z. Naturforsch.* **11** b, 708 (1956). — KAPLAN, R. W.: *Arch. Mikrobiol.* **24**, 60 (1956). — KOSKI, V. M., and J. H. C. SMITH: *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 189 (1951).

POLGAR, A., C. B. VAN NIEL and L. ZECHMEISTER: *Arch. Biochem.* **5**, 243 (1944). — PORTER, J. W., and R. E. LINCOLN: *Arch. Biochem.* **27**, 390 (1950).

RABOURN, W. J., F. W. QUACKENBUSH and J. W. PORTER: *Arch. Biochem.* **48**, 267 (1954).

SISTROM, W. R., M. GRIFFITHS and R. Y. STANIER: *J. cell. comp. Physiol.* **48**, 459 (1956). — STANIER, R. Y., and G. COHEN-BAZIRE: *Microbial Ecology*, Seventh Symp. Soc. Gen. Microbiol. 56 (1957). — STARR, M. P., and S. SAPERSTEIN: *Arch. Biochem.* **43**, 157 (1953). — SWART-FÜCHTBAUER, H., und A. RIPPEL-BALDES: *Arch. Mikrobiol.* **16**, 358 (1951). — SZYBALSKI, W.: *Science* **1952**, 46.

WALLACE, R. H., and A. E. SCHWARTING: *Plant Physiol.* **29**, 431 (1954).

(Aus dem Institut für Biochemie des Bodens der Forschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode und der Physikal.-technischen Bundesanstalt Braunschweig)

Der Einfluß sehr hoher Drücke auf *Aspergillus niger**

Von

E. KÜSTER und J. GIELESSEN

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 30. April 1958)

Die ersten Arbeiten, in denen Mikroorganismen einer Druckbehandlung unterworfen wurden, gehen auf E. BUCHNER (1897) zurück, der mit 400—500 at Druck aus Hefen einen enzymatisch aktiven Preßsaft gewinnen konnte. Bis in die neueste Zeit hinein sind viele Untersuchungen durchgeführt worden, die sich mit der Gewinnung von Enzymen, Vaccinen u. dgl. mit Hilfe von hydrostatischem Druck sowie auch mit Druckbeeinflussung der Enzymaktivitäten befassen. So wird z. B. Trypsin und Chymotrypsin nach A. L. CURL u. E. F. JANSEN (1950) durch 6000 bzw. 4500 at schon nach wenigen Minuten Einwirkungsdauer erheblich inaktiviert, wobei die Inaktivierung bei steigender Enzymkonzentration prozentual zunimmt. Ein mehrfach aufeinanderfolgender Druckanstieg und -abfall erhöht die Aktivitätsminderung. Diese durch Druck erzielten Schädigungen bei Trypsin und Chymotrypsin sind irreversibel. Auch Xanthindehydrase der Milch wird bei 5000—6000 at Druck inaktiviert, wobei gut gereinigte und hochkonzentrierte Enzympräparate besonders empfindlich waren; sehr ähnlich verhält sich hier auch die Ultraschallwirkung (L. ROBERT u. N. NOLLA 1953). Bei der Bernsteinsäure-Dehydrogenase nimmt mit steigender Druckerhöhung von 200—1000 at eine Aktivitätsminderung zu, in der gleichen Richtung wirkt auch die Dauer der Druckbehandlung (R. Y. MORITA u. C. E. ZOBELL 1956).

Eine andere Arbeitsrichtung, in der die Druckbehandlung und -toleranz von Mikroorganismen bearbeitet wird, ist die Meeres- und Geomikrobiologie. Mit je 1 m Tiefe nimmt der Druck bekanntlich um etwa 0,1 at zu. Aus Meerestiefen von 4000 bis 10000 m Tiefe konnten sogenannte „barophile“ Bakterien isoliert werden, die sich am besten bei 400—1000 at Druck entwickelten. Diese barophilen Bakterien aus der Tiefsee werden sehr eingehend von C. E. ZOBELL u. Mitarb. (1953) bearbeitet. In diesem Zusammenhang sind auch Angaben über die Drucktoleranz verschiedener Bakterien enthalten. Während der lag-Phase sind die Bakterien besonders druckempfindlich, die Absterberate ist dabei eine Funktion von Zeit und Temperatur. Die negative Wirkung des hydrostatischen Drucks wird durch einen ungünstigen osmotischen Druck verstärkt. Die Hemmeffekte von abnorm hohem Druck lassen sich letzten Endes wahrscheinlich auf 2 verschiedene Mechanismen zurückführen: Drucke von 50—500 at verändern einige physiologische Reaktionen, auch solche von lebenswichtiger Bedeutung, höhere Drucke bis 15000 at führen zu irreversiblen Veränderungen, z. B. zur Denaturierung von Enzymen und Protoplasma.

Ähnliche Verhältnisse wie im Wasser liegen wohl auch in tieferen Erdschichten vor, aus denen ebenfalls barotolerante und barophile Mikroorganismen isoliert werden konnten. T. BECK u. H. POSCHENRIEDER (1957) sehen in der Drucktoleranz

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

sogar ein Kriterium für den autochthonen Charakter der Braunkohlenmikroflora. *Pseudomonas fluorescens*-Isolierungen aus Braunkohlenlagern erwiesen sich einer mehrtägigen Druckbehandlung von 400 at gegenüber wesentlich widerstandsfähiger als Hefen, Streptomycceten und Bakterien (*Proteus vulgaris* und *Serratia*), die schon nach 2 Tagen bei 200 at in ihrer Entwicklung erheblich geschädigt wurden. Bei verschiedenen Süßwasseralgen beobachtete G. STURM (1957) bei mehrtägiger niedriger Druckeinwirkung bis 300 at eine Vermehrung der Zellteilung, die aber bei einer Druckerhöhung über 300 at deutlich absinkt, wobei niedrige Temperaturen die Druckwirkung verstärken und erhöhte Temperaturen sie abschwächen.

In den eigenen Untersuchungen, die in den Jahren 1950/51 durchgeführt wurden, sollte festgestellt werden, wieweit eine Behandlung mit extrem hohen Drücken eine Ausscheidung und Isolierung von mikrobiellen Stoffwechselprodukten, z. B. Antibiotica, die in der Zelle gebildet werden, beschleunigt und erleichtert wird. Nach Einwirkung von Ultraschall auf Mikroorganismen konnten schon ähnliche Effekte erzielt werden (J. BEUMER u. M. P. BEUMER-JOCHMANS 1950, H. HOMPESCH 1953 u. a.), allerdings sollte bei den Druckversuchen darauf geachtet werden, in der Nachwirkung durch eine veränderte Zellwandstruktur eine verbesserte Extraktion zu erreichen. Aus technischen Gründen konnten diese Versuche leider nicht bis zur letzten Konsequenz durchgeführt werden, so daß sie im Stadium der Vorversuche abgebrochen werden mußten, die uns aber einer kurzen Mitteilung wert scheinen.

Material und Methoden

Der Druck bis 10000 at wurde in einer Hochdruckanlage nach Basset erzeugt. Sie arbeitet nach dem Prinzip der hydraulischen Übersetzung. Eine Vorpumpe wirkt bei dieser Anlage auf einen großen, beweglichen Stempel, der seinerseits einen Stempel mit kleinerem Querschnitt in den eigentlichen Hochdruckraum hineindrückt. Das Verhältnis der Querschnitte der beiden Stempel beträgt etwa 1 : 17. Der Hochdruck läßt sich aus dem gemessenen Vordruck und dem angeführten Übersetzungsverhältnis berechnen. Diese einfache Art der Druckberechnung — infolge der Reibung der Stempel ist der im Hochdruckraum gemessene Druck stets kleiner als der so berechnete Druck — reicht für die hier beschriebenen Untersuchungen aus. In den ersten Versuchen wurde die gesamte Druckkammer mit einer wäßrigen Sporensuspension gefüllt, später wurde statt dessen in die Druckkammer ein verschlossener Gummibehälter eingeführt, der die Sporensuspension enthielt. Hierbei wurde als Druckflüssigkeit, die den mit einem Gummistopfen verschlossenen Gummibehälter umgab, eine Mischung aus 50 Teilen Paraffinöl DAB 6, 25 Teilen Dekalin und 25 Teilen Petroleum verwendet. Verwendet man als Druckflüssigkeit Wasser, so tritt bei 20° C bei einem Druck von etwa 9000 at die feste Eisphase VI auf. Als Versuchsobjekt diente *Aspergillus niger* Stamm Zwetsche (aus dem Inst. f. Mikrobiologie der Univ. Göttingen), der sich durch eine besonders intensive rote Farbstoffbildung auszeichnete. Die bedruckten Sporensuspensionen wurden auf eine Nährlösung mit 2% Rohrzucker und 1% KNO_3 geimpft, auf der die Wachstumsentwicklung, Farbstoffbildung und dgl. beobachtet wurden. Zur Keimzählung wurden die Suspensionen in gleicher Verdünnung auf Petrischalen mit Würze-Agar gebracht. Die Chitin-Bestimmung erfolgte nach der Methode von G. BEHR (1930). Die Stickstoff-Bestimmungen wurden im Chem. Untersuchungslaboratorium der Forschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode nach der Methode Dumas ausgeführt.

Ergebnisse

Bei einer Druckbehandlung von 8000 und 10000 at mit verschiedener Dauer zeigten sich bei einer *Asp. niger*-Sporensuspension in Nährlösung unterschiedliche Effekte. Wie Tab. 1 zeigt, ergeben sich nach Überimpfen auf Würze-Agar die stärksten Hemmungen bei einer 1stündigen Einwirkung von 10000 at, dagegen kommt es nach einer längeren Behandlung mit 8000 at zu einer deutlichen Erhöhung der Keimzahlen.

Tabelle 1. Wachstum nach Druckbehandlung

Behandlung	Keimzahl auf Würze-Agar (Petrischalen) Beimpfung mit				Myceltrockengewicht 1. mg (Nährlösung)				
					Beimpfung mit			Ø	
	0,05 cm³		0,1 cm³		0,5 cm³	1,0 cm³	2,0 cm³	abs.	rel.
	abs.	rel.	abs.	rel.					
1 Std 8000 at	27	130	36	115	110	106	94	103	82
2 Std 8000 at	16	75	24	80	104	102	109	108	86
1 Std 10000 at	8	40	10	30	108	121	138	122	97
2 Std 10000 at	16	75	18	60	114	116	123	118	93
14 Std 8000 at	46	200	52	170	126	119	128	124	98
Kontrolle	21	100	31	100	121	131	126	126	100

Diese Förderung der Keimung läßt sich möglicherweise mit einer Entwicklung der Sporen beim längeren Stehen der Nährlösung in der Druckkammer erklären. Die Pilzentwicklung auf der Nährlösung nach Beimpfung mit bedruckten Sporen war in allen Versuchen, die mehrfach wiederholt wurden, im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert, was in den Mycelgewichten nicht so deutlich zum Ausdruck kommt.

Vor allem fiel die sehr schwache und sogar manchmal fehlende Sporenbildung auf, entsprechend schwach war auch die Farbstoffbildung, außerdem war das Mycel sehr stark mit Feuchtigkeit vollgesogen. In einem Kontrollversuch, der unbeimpft blieb, wurde festgestellt, daß die Nährlösung sich durch die Druckbehandlung nicht veränderte, der C- und N-Gehalt blieb der gleiche. Außerdem wurde bei diesem Versuch ein verschlossener Gummibehälter für die weiteren Experimente für geeignet befunden. Durch Anfärben der Druckflüssigkeit mit Neutralrot konnte gezeigt werden, daß der Gummibehälter dicht war, und die Sporensuspension bei der Behandlung nicht verunreinigt wurde. Es erwies sich weiterhin als gleich, ob die Sporen in Wasser oder in Nährlösung suspendiert dem Druck ausgesetzt wurden, in beiden Fällen war die nachfolgende Entwicklung auf einer frischen Nährlösung langsamer und zeigte eine schwächere Sporenbildung. Die weiteren Versuche wurden daraufhin stets mit einer wäßrigen Suspension durchgeführt. Bei der Ultraschallbehandlung ist bekannt, daß sich in Wasser meßbare Mengen

von H_2O_2 feststellen lassen (u. a. E. KÜSTER u. H. THEISMANN 1949). Eine derartige chemische Wirkung tritt aber bei der Druckbehandlung nicht auf, wie Versuche mit einmaligem und mehrmaligem Druckwechsel auf 8000 at zeigten. In keinem Fall konnte mit TiSO_4 Wasserstoffperoxyd nachgewiesen werden. Die Beobachtung, daß das Mycel aus den behandelten Sporen schwammig weich und nicht so spröde wie das der Kontrollkulturen war, ließ die Vermutung nahelegen, daß die Zellwandstruktur des Mycels verändert war. Gleiche Mengen einer wäßrigen Sporensuspension wurden vor und nach einer Druckbehandlung von 2 Std bei 8000 at auf eine Rohrzucker- KNO_3 -Lösung geimpft und der unterschiedliche Chitin-Gehalt nach 30tägigem Wachstum beurteilt.

Tabelle 2. Chitin- und N-Gehalt des Mycels aus behandelten und unbehandelten Sporensuspensionen

	unbehandelt	behandelt
Mycelentwicklung nach 8 Tagen	geschl. Myceldecke	vereinzelte Mycelinseln
Sporenbildung nach 8 Tagen	gut	fehlend
Farbe des Kulturfiltrats nach 30 Tagen	gelblich	gelblich
pH des Kulturfiltrats	6,1	5,35
Mycelgewicht lufttrocken	22,76 g	21,61 g = 95,0%
Myceltrockengewicht	20,28 g	19,32 g = 95,2%
Myceltrockengewicht in Prozent	89,11 %	89,46 %
Chitin absolut	1,091 g	0,744 g = 68,2%
Chitin in Prozent d. Mycelgew.	5,36 %	3,85 %
Chitin-N (theoret. 6,5%)	70,9 mg	48,4 mg
N-Gehalt d. Mycelgew. abs.	847,7 mg	844,3 mg
N-Gehalt in Prozent d. Mycelgew.	4,18 %	4,37 % = 104,5%
Ges. N abzügl. Chitin-N in mg	776,8 mg	795,9 mg = 102,5%

Diese Zahlen der Tab. 2 zeigen deutlich, daß der Chitingehalt der behandelten Kultur erheblich niedriger ist als der der Kontrolle. Der prozentuale N-Gehalt des Mycels ist dagegen der gleiche geblieben, das besagt, daß die reduzierte Chitinbildung nicht auf eine gestörte N-Aufnahme zurückgeführt werden kann, sondern andere, noch unbekannte Ursachen haben muß. Interessant bleibt dabei die Feststellung, daß die Nachkulturen aus druckbehandelten Sporen einen geringeren Chitingehalt aufweisen. Auffallend war auch die geringere oder fast fehlende Sporenbildung in der Nachkultur. Durch eine Veränderung des C- und N-Gehaltes in der Nährlösung wurde versucht, die Sporenbildung anzuregen. In jedem Fall blieb aber die Sporenbildung der behandelten Nachkultur hinter der unbehandelten Kontrolle zurück.

Wurden Sporen der behandelten und unbehandelten Nachkulturen vorsichtig abgesaugt und einer nochmaligen Druckbehandlung von 2 Std bei 8000 at ausgesetzt, so zeigte sich wiederum die gleiche Erscheinung,

daß eine zweifache Behandlung auf das Wachstum und die Sporenbildung am ungünstigsten wirkt.

Es ergab sich folgende Versuchsanstellung mit den entsprechenden Ergebnissen:

Unbehandelt—Unbehandelt:	Wachstum und Sporenbildung gut
Unbehandelt—Behandelt:	} schlechtes Wachstum und geringe Sporenbildung
Behandelt —Unbehandelt:	
Behandelt —Behandelt:	sehr geringes Wachstum und fehlende Sporenbildung

Bei der Nachkultur auf Würze-Agar hatte es sich gezeigt, daß eine gewisse Sporenmenge noch keimfähig war. Durch eine mehrfache Druckbehandlung, wobei Druck und Behandlungsdauer gesteigert wurden, sollte versucht werden, durch eine Adaptation druckresistente Sporen zu gewinnen. In den einzelnen Passagen wurde der Druck von 2000 auf 6000 at erhöht, die Behandlungsdauer betrug 1 bzw. 2 Std. Im Vergleich zu unbehandelten immer nur einmal bedruckten Sporensuspensionen war das Wachstum der mehrfach behandelten Kulturen in den ersten 4 Passagen (1/2000, 2/2000, 2/2000, 1/4000) langsamer und schlechter. Nach der 5. Passage entwickelten sich die dauernd behandelten, sogenannten adaptierten Kulturen aber wesentlich besser. Die Passagen wurden bis zu 11 mal ausgedehnt, wobei noch eine Parallelreihe lief, die nicht mit 2000 at vorbehandelt worden war, sondern bei der gleich mit 4000 at begonnen wurde. Auch hier wurde das gleiche beobachtet, daß nach mehreren Passagen eine Dauerbehandlung das bessere Wachstum ergab.

In einem weiteren Versuch wurden die Geschwindigkeiten für den Druckanstieg und Druckabfall variiert. In zwei Versuchsreihen wurde die Wirkung eines schnellen Druckanstieges auf 8000 at (5 min) und langsamen Druckabfalles (30 min) mit der eines langsamen Druckanstieges (30 min) und raschen Druckabfalles (5 min) verglichen. Die schlechteste Entwicklung gab eine Sporensuspension, die mit raschem Druckabfall behandelt worden war. Das läßt darauf schließen, daß durch die Druckentspannung die Sporen in besonders starkem Maße zerstört

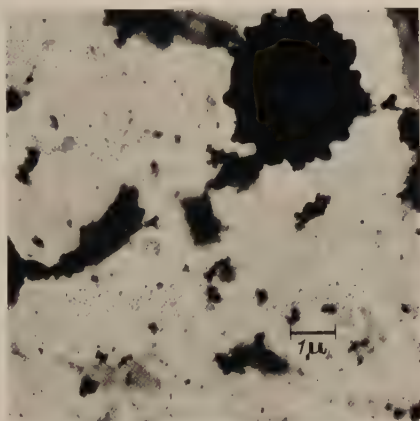


Abb. 1. Sporen von *Asp. niger* nach Druckbehandlung. Erklärung im Text

werden. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte die zerstörende Wirkung des Druckes deutlich beobachtet werden.

Als Beispiel zeigt Abb. 1 neben einer wohl erhaltenen Pilzspore mit ihren charakteristischen Höckern kleine und kleinste Bruchstücke von Sporen. Die sehr kleinen kugelförmigen Teilchen können möglicherweise aus dem Innern der Sporen stammen. Bei dieser Aufnahme von mehrfach behandelten, sog. adaptierten Kulturen sind neben den Sporenbruchstücken noch unversehrt gebliebene Sporen zu finden, die bei den nur einmal bedruckten Sporensuspensionen fast stets fehlen.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sagen wir Herrn Dr. H. BEUTELSPACHER vom Institut f. Biochemie des Bodens der Forsch.-Anst. f. Landw. unseren besten Dank.

Zusammenfassung

Nach Behandlung einer Sporensuspension von *Asp. niger* mit sehr hohen Drücken bis zu 10000 at entwickelte sich diese in der Nachkultur nur sehr schlecht. Einerseits werden sehr viele Sporen zerstört, wobei die Druckentspannung wahrscheinlich eine stärker zerstörende Wirkung ausübt als der Druckanstieg und die Druckdauer. Andererseits wiesen die Nachkulturen aus behandelten Sporen einen deutlich niedrigeren Chitin-Gehalt auf als die entsprechenden Vergleichskulturen. Das führte zu einer stark veränderten Mycelkonsistenz, außerdem war eine erneute Sporenbildung nach Druckbehandlung sehr gestört. Durch mehrfache Druckpassagen ließen sich druckresistente Sporen gewinnen, die sich in der Nachkultur deutlich besser entwickelten als die nicht vorbehandelten und nur einmal bedruckten Sporen.

Literatur

BECK, T., u. H. POSCHENRIEDER: Zbl. Bakt. II. Abt. **110**, 534—539 (1957). — BEHR, G.: Arch. Mikrobiol. **1**, 418—444 (1930). — BEUMER, J., u. M. P. BEUMER-JOCHMANS: Ann. Inst. Pasteur **79**, 521—531 (1950). — BUCHNER, E.: Ber. dtsch. chem. Ges. **30**, 117—124 (1897).

CURL, A. L., u. E. F. JANSEN: J. biol. Chem. **184**, 45—54 (1950).

HOMPESCH, H.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **159**, 358—361 (1953).

KÜSTER, E., u. H. THEISMANN: Naturwissenschaften **36**, 380 (1949).

MORITA, R. Y., u. C. E. ZOBELL: J. Bact. **71**, 668—672 (1956).

ROBERT, L., u. N. NOLLA: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **35**, 1363—1373, 1375 bis 1380 (1953).

STURM, G.: Arch. Mikrobiol. **28**, 109—125 (1957).

ZOBELL, C. E.: Atti VI. Int. Congr. Microbiol. Roma **7**, 372—373 (1953).

(Bacteriology Division, Science Service,
Canada Department of Agriculture, Ottawa)

Two New Species of *Arthrobacter* Requiring Respectively Vitamin B₁₂ and the Terregens Factor^{1*}

By

A. G. LOCHHEAD

With 5 Figures in the Text

(Eingegangen am 17. März 1958)

There is increasing evidence supporting the view that microbial growth promoting substances are closely related to ecological aspects of the indigenous microflora of soils and that growth factor effects, which have received much less attention than antagonistic phenomena, could well be as important as the latter in affecting the microbial equilibrium in such a densely populated environment as arable soil (LOCHHEAD 1958). It is now well established that B-vitamins as well as other microbial growth factors are present in soil, and that microorganisms which require growth factors, as well as those which are able to synthesize such substances, comprise numerically important segments of the soil microflora (LOCHHEAD 1957; LOCHHEAD and BURTON 1957).

Vitamin B₁₂ and the terregens factor (LOCHHEAD and BURTON 1953a, 1953b) are two microbial growth factors found to occur in soil; it is therefore not surprising that organisms are present for which these substances are essential to growth. In a study of 2877 cultures, isolated by nonselective procedures to permit quantitative evaluation of three control field soils and rhizosphere soils of three crop plants, LOCHHEAD and BURTON (1956) found B₁₂-requiring bacteria to comprise 6.4, 7.0 and 7.8% of the population of the controls, corresponding to 4.3, 3.9 and 4.1 millions per g on the basis of the total plate counts. In the rhizosphere the percentages were 3.7% (wheat), 3.8% (soybeans) and 2.7% (barley). Bacteria requiring the terregens factor were roughly one-tenth as numerous as those dependent on B₁₂ and showed a similar pattern with respect to control and rhizosphere soils.

In the course of these investigations various organisms were studied which, in view of their requirements for specific growth factors, showed promise for use in the detection of various growth-promoting substances. Some of these cultures have recently been used as indicator organisms in

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

¹ Contribution No. 455, Bacteriology Division.

studies of the capability of the predominant soil bacteria for synthesis of growth factors (LOCHHEAD 1957). The present report deals with the morphological, cultural and physiological characteristics of two of these organisms, members of the genus *Arthrobacter* (BREED et al. 1957), for which vitamin B₁₂ and the terregens factor (TF) represent, respectively, essential growth factors¹. Preliminary information, particularly on vitamin requirements, has been given in earlier reports (BURTON 1957; LOCHHEAD and BURTON 1957).

Material and Methods

The organisms were selected from a large number of isolates obtained from soil in 1955 by plating and isolation procedures previously described (LOCHHEAD and BURTON 1956, 1957) and screened for their nutritional requirements by the method of LOCHHEAD and CHASE (1943). Organisms requiring B₁₂ or TF comprised the great majority of those unable to grow in media containing salts, glucose and amino acids with added B-vitamins (other than B₁₂) or yeast extract, but which developed well on the addition of soil extract. In the case of those for which B₁₂ was essential soil extract could be replaced by the pure vitamin (2 mμg/ml), while TF-requiring forms could develop upon addition of a purified concentrate of the factor (0.1 μg/ml), extracted from culture filtrates of *Arthrobacter pascens*, in place of soil extract (BURTON et al. 1954).

Growth factors, other than B₁₂ or TF, essential for the organisms were determined by methods described by LOCHHEAD and BURTON (1957). These involved the use of a basal medium containing inorganic salts, glucose 0.1% and vitamin-free "Casamino acids" (Difco) 0.1% for studying the essentiality of the following vitamins: thiamine, biotin, pantothenic acid, riboflavin, nicotinic acid, pyridoxine (with pyridoxal and pyridoxamine), *p*-aminobenzoic acid, folic acid, inositol and choline.

In experiments involving quantitative measurements of growth response duplicate tests were carried out with 50-ml Erlenmeyer flasks containing 10 ml of medium. Inoculation was made with washed cells and cultures incubated on a shaker at 26° C. for 48 hours after which turbidity readings were made with a Klett-Summers photometer.

The morphological and physiological properties of the organisms were studied by employing appropriate solid or liquid media which were in most cases modified to insure the presence of the requisite growth factors. This was effected by the addition of B₁₂ (0.2 μg/100 ml) or TF (10 μg/100 ml) according to the needs of the culture, plus either yeast extract (0.1%) or the specific additional vitamins required by the organism in question. Tests were carried out at 26° C.

Growth Factor Relationships

The need of the cultures for vitamin B₁₂ and the terregens factor respectively is shown in Fig. 1. Neither organism shows growth in a medium of salts, glucose, "Casamino acids" and yeast extract. However, No. 541 develops well on addition of B₁₂; No. 401 on the other hand shows no response to B₁₂ but grows well on addition of TF which is ineffective for promoting growth of No. 541.

¹ The cooperation of Miss M. O. BURTON, formerly of this laboratory, during the earlier stages of the work here reported is acknowledged with thanks.

It was found in the preliminary experiments that in addition to B₁₂ (or TF) yeast extract was necessary for growth of the organisms, suggesting that other vitamins were required. Qualitative studies showed that for No. 541 thiamine was needed and for No. 401 thiamine and

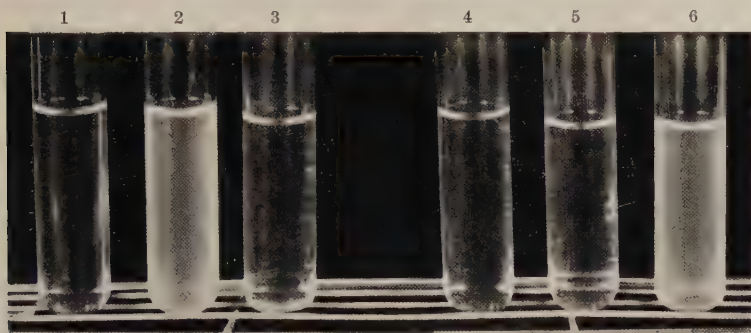


Fig. 1. Effect of vitamin B₁₂ and terregens factor on growth of No. 541 *Arthrobacter duodecadis* n. sp. (tubes 1—3), and No. 401 *Arthrobacter flavescens* n. sp. (tubes 4—6). Tubes 1 and 4: salts, glucose, "Casamino acids", yeast extract. Tubes 2 and 5: plus vitamin B₁₂ (2 mμg/ml); Tubes 3 and 6: plus terregens factor (0.1 μg/ml)

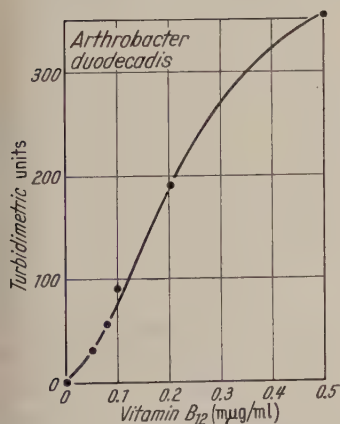


Fig. 2. Response of *Arthrobacter duodecadis* n. sp. to vitamin B₁₂

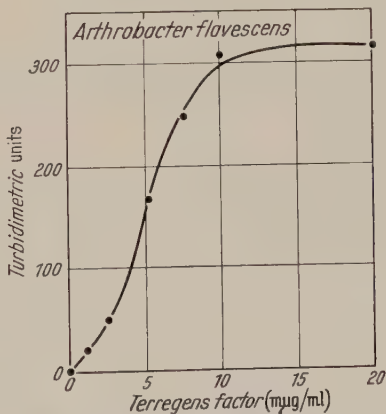


Fig. 3. Response of *Arthrobacter flavescens* n. sp. to terregens factor

biotin. The relationship of various factors to the development of the two organisms is shown in Table 1, in which growth responses are expressed in terms of turbidimetric units. With respect to culture No. 541 it is of interest that Factor B, the non-nucleotide portion of the molecule of vitamin B₁₂, is unable to replace cyanocobalamin in its nutrition.

The effect of the concentration of B₁₂ and TF, respectively, on the growth of the organisms is shown graphically in Figs. 2 and 3. In the

experiments in question a basal medium of salts, glucose 0.1% and yeast extract 0.1% was used. Under the conditions of the tests the essentiality of the factors in question was confirmed.

Morphology and Physiology

Organism No. 541 — Arthrobacter duodecadis n. sp.

Young cultures show Gram-negative, non-sporeforming rods varying in length, usually 1.5 to 4 μ and 0.5 to 0.6 μ wide (Fig. 4, A). Though many V- and T-shaped formations occur rods do not exhibit irregularity

Table 1. *Growth response of A. duodecadis and A. flavescens to vitamin B₁₂ and terregens factor respectively*

Essential growth factors →	<i>A. duodecadis</i> (No. 541)	<i>A. flavescens</i> (No. 401)
	vitamin B ₁₂ , thiamine	terregens factor, thiamine, biotin
<i>Addenda to basal medium</i> ¹	<i>Growth</i> ²	<i>Growth</i>
None	5	18
14 growth factors	278	280
14 growth factors minus vitamin B ₁₂	27	—
Vitamin B ₁₂ , thiamine	274	—
Vitamin B ₁₂ , biotin	27	—
Vitamin B ₁₂ , thiamine, biotin	267	—
Factor B, thiamine, biotin	20	—
14 Growth factors minus TF	—	20
TF, thiamine, biotin	—	268
Yeast extract	9	7
Yeast extract, B ₁₂	410	—
Yeast extract, Factor B	10	—
Yeast extract, TF	—	367

¹ Salts, glucose, vitamin free "Casamino acids". ² Turbidity units.

in shape to the degree shown by certain other species of *Arthrobacter* such as *A. globiformis* or *A. terregens*. In addition to the rods, young cultures show large coccoid bodies from many of which may be observed germinating rods, generally one to three in number. Such coccoid cells are usually Gram-negative though under certain cultural conditions occasional Gram-positive forms may be seen. Cultures undergo characteristic changes in morphology so that usually after three days small Gram-negative coccoid cells, 0.4 to 0.6 μ , and varying somewhat with the medium, become predominant, formed by fragmentation of the rod forms (Fig. 4, B). In addition, a smaller number of larger coccoids with somewhat greater dye-retaining capacity may be noted on most media. These represent the "cystites" observed in members of this genus by JENSEN (1934) and CONN and DIMMICK (1947) which give rise to rod forms on transfer to fresh medium. Motility has not been observed.

The organism requires vitamin B₁₂ and thiamine for growth. Vitamin B₁₂ is not replaceable by thymidine, methionine or Factor B.

Colonies on agar are circular, entire, convex with smooth surface, cream-colored to pale brown and somewhat translucent, and may reach a diameter of 1.5 to 2 mm. Surface streak cultures on soil extract agar show moderate, filiform growth, only slightly raised, with finely lobate edge, cream to pale brown in color, translucent with a waxy lustre and soft consistency. On nutrient (beef-peptone) agar there is no growth but



Fig. 4 A

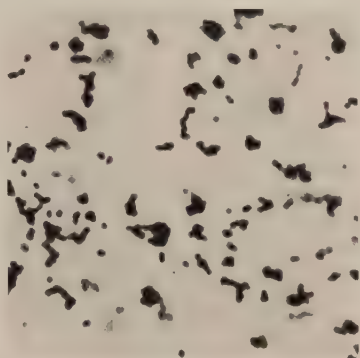


Fig. 4 B

Fig. 4. *Arthrobacter duodecadiis* n. sp. A 20-hour culture on salts-glucose-Casamino acids-vitamin agar;
B 5-day culture on soil extract agar ($\times 1200$)

with the addition of the requisite vitamins good growth occurs though without chromogenesis; upon the addition of soil extract growth is brownish with the surface developing a "ground glass" appearance due to secondary colonies. Growth is more abundant on a medium of salts, glucose, "Casamino acids", yeast extract and B₁₂ on which it is colorless to very pale brown and less translucent. Stab cultures in soil extract-yeast semisolid agar show growth along the line of inoculation, best near the top with brownish surface growth. In nutrient broth no growth is observed, but on addition of vitamins the organism produces slight turbidity without surface pellicle but with a slight, stringy sediment.

Stab cultures in nutrient gelatin containing yeast extract and B₁₂ show saccate liquefaction which later becomes stratiform with clear liquid and some brownish sediment. The action may be confirmed by use of plates of soil extract agar with 0.4% gelatin on which streak cultures show a characteristic zone of clearing. Similar plates with 1% starch show no diastatic action. Reduction of nitrate to nitrite occurs in nitrate broth with growth factor addenda. In milk containing yeast extract and B₁₂ no change is evident within one month; however, on soil extract plates with 10% skim milk streak cultures reveal hydrolysis of casein by a definite

zone of clearing. In nutrient broth supplemented by yeast extract and B₁₂ the addition of glucose, sucrose or lactose shows little or no effect on the growth of the organism nor is acid produced. Neither indole nor acetyl-methyl-carbinol is formed in appropriate media.

Tests in suitable media containing the vitamins essential to growth the organism is unable to utilize nitrate or ammonium salts as sole source of nitrogen, nor citrate as sole carbon source. The temperature range for growth of the culture extends from approximately 12° to 35° C., only a trace of growth being evident at 10° and none at 37° C. Good growth is shown from 20° to 32° C.

Organism No. 401 — Arthrobacter flavescens n. sp.

Young cultures occur as non-sporeforming rods varying in width from 0.4 to 0.6 μ and in length from 1 to 6 μ , the average dimensions varying to some degree with the medium (Fig. 5, A). The rods may vary in form from short, straight cells to longer cells which may be bent, curved or swollen while occasionally rudimentary budding may be observed. Many V, Y and T-shaped formations may occur. The rods are in general Gram-negative though more rarely Gram-variable to Gram-positive

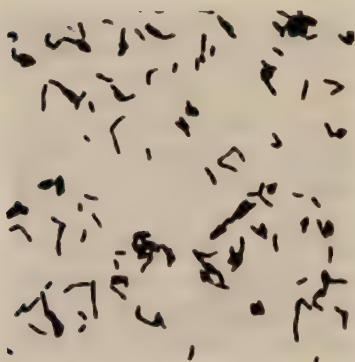


Fig. 5 A

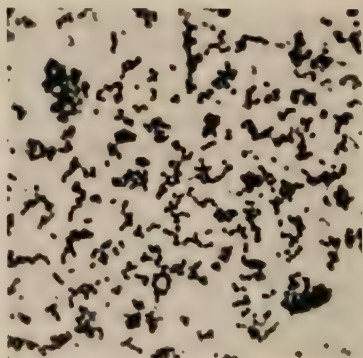


Fig. 5 B

Fig. 5. *Arthrobacter flavescens* n. sp. A 20-hour culture on soil extract agar; B 5-day culture on soil extract agar ($\times 1200$)

forms may occur. The organism passes rapidly from the rod to the coccoid stage so that after one day small round to oval cells appear, apparently formed by fragmentation of the rods and subsequently the culture consists entirely of coccoids (Fig. 5, B). The coccoids, which vary from Gram-negative to Gram-positive, depending upon the medium and age of the culture are approximately 0.5 μ in diameter. Motility has not been observed.

This organism requires for growth the terregens factor, which may be replaced by coprogen or ferrichrome; in addition, thiamine and biotin are essential for growth.

Colonies on agar plates are circular, entire, convex, yellow, with a smooth, glistening surface, and may reach a diameter of 2.5 mm. Surface streak cultures show a moderate to abundant filiform growth, with finely lobate edge, smooth, opaque, glistening and soft; the color varies from pale yellow in soil extract agar to bright lemon yellow on media containing "Casamino acids". There is no growth on plain nutrient agar but with the addition of the appropriate growth factors the organism develops well. Stab cultures in soil extract-yeast semisolid grow best near the surface where the growth is yellow. In plain nutrient broth no growth is seen but with added growth factors there is moderate uniform turbidity, no surface pellicle but a stringy sediment.

Stab cultures in nutrient gelatin, plus yeast extract and TF, show a liquefaction, at first crateriform but later stratiform; on soil extract agar plus 0.4% gelatin streak cultures give a zone of clearing. Diastatic action is observed on starch agar with growth factors. Nitrates are reduced to nitrite in appropriate media. In milk with yeast extract and TF no change is caused; however streak cultures on soil extract agar with 10% skim milk show case in liquefaction. In suitable basal media the addition of glucose causes no change in reaction; however, slight acidity is produced with sucrose and slight alkalinity with lactose. Indole and acetyl-methyl-carbinol are not formed.

In suitable media containing the essential growth factors the organism is unable to utilize inorganic nitrogen as sole nitrogen source, nor citrate as sole source of carbon. The temperature range for growth extends from approximately 8° to 40° C. with best growth between 20° and 32° C. The organism develops only slightly at 10° but grows well at 37° C.

Systematic Position of the Organisms

CONN (1928) first called attention to the existence of a bacterium occurring in soil which showed pronounced pleomorphism in that it changed from a distinct rod in young culture to a coccus form in older culture and showed, in the rod stage, morphological characteristics suggestive of *Corynebacterium*. In view of certain differences that distinguished this soil organism from corynebacteria of animal origin, however, CONN did not assign it to this genus but named it *Bacterium globiforme*. Later CONN and DIMMICK (1947) proposed a new genus, *Arthrobacter*, for the inclusion of soil forms typified by *B. globiforme* (*Arthrobacter globiformis*) which, though related to *Corynebacterium*, were regarded as having characteristics sufficiently distinct to justify generic separation. The genus *Arthrobacter* has been given recognition in the 7th edition of Bergey's Manual (BREED et al. 1957).

It is considered that both of the organisms here described possess morphological and physiological characters that indicate a close relationship to the bacteria which have been assigned to this genus and that they fall within the definition of *Arthrobacter*. At the same time they exhibit properties that clearly distinguish them from previously described species of the genus and from each other; such differences are believed sufficient to warrant specific distinction. Accordingly organism No. 541, requiring vitamin B₁₂ is herewith named *Arthrobacter duodecadis* n. sp. and organism No. 401, which requires the terregens factor, *Arthrobacter flavescens* n. sp.

Summary

The morphological, cultural, nutritional and general physiological properties of two species of bacteria, isolated from soil, are described which require for growth vitamin B₁₂ and the terregens factor respectively. Both organisms undergo the change in morphology from a rod stage in young culture to a coccoid stage in older culture which is characteristic of members of the genus *Arthrobacter* CONN and DIMMICK and are considered to be most appropriately assigned to this genus. In view of their differences from other described species and from each other the organism for which vitamin B₁₂ is essential is named *Arthrobacter duodecadis* n. sp. and that requiring the terregens factor *Arthrobacter flavescens* n. sp.

References

- BREED, R. S., E. G. D. MURRAY and N. R. SMITH: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th Ed. Baltimore 1957. — BURTON, M. O.: Characteristics of bacteria requiring the terregens factor. *Canad. J. Microbiol.* **3**, 107 (1957). — BURTON, M. O., F. J. SOWDEN and A. G. LOCHHEAD: Studies on the isolation and nature of the terregens factor. *Canad. J. Biochem.* **32**, 400 (1954).
- CONN, H. J.: A type of bacteria abundant in productive soils, but apparently lacking in certain soils of low productivity. *N. Y. State Agr. Expt. Sta. Tech. Bull.* 138 (1928). — CONN, H. J., and I. DIMMICK: Soil bacteria similar in morphology to *Mycobacterium* and *Corynebacterium*. *J. Bact.* **54**, 291 (1947).
- JENSEN, H. L.: Studies on saprophytic *Mycobacteria* and *Corynebacteria*. *Proc. Linnean Soc. N. S. Wales* **59**, 19 (1934).
- LOCHHEAD, A. G.: Qualitative studies of soil microorganisms. XV. Capability of the predominant bacterial flora for synthesis of various growth factors. *Soil Sci.* **84**, 395 (1957). — Soil bacteria and growth-promoting substances. *Bact. Rev.* (in press). — LOCHHEAD, A. G., and M. O. BURTON: An essential bacterial growth factor produced by microbial synthesis. *Can. J. Botany* **31**, 7 (1953a). — A bacterial growth factor produced by a soil organism. *Atti VI Congr. Intern. Microbiol. (Roma)* **1**, 298 (1953b). — The incidence in soil of bacteria requiring vitamin B₁₂ and the terregens factor. *Soil Sci.* **82**, 237 (1956). — Qualitative studies of soil microorganisms. XIV. Specific vitamin requirements of the predominant bacterial flora. *Canad. J. Microbiol.* **3**, 35 (1957). — LOCHHEAD, A. G., and F. E. CHASE: Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. *Soil Sci.* **55**, 185 (1943).

(From the Department of Bacteriology, The University of Texas,
Austin, Texas)

On the Chromatographic Behavior of Dipicolinic Acid*

By

H. H. MARTIN** and J. W. FOSTER

With 4 Figures in the text

(Eingegangen am 24. Februar 1958)

The remarkable concentration of dipicolinic acid (DPA) in bacteria spores (POWELL 1953; PERRY and FOSTER 1955; TINELLI 1955) naturally directs interest to the biosynthesis, function and other aspects of this compound. Consequently, methods for the isolation, purification, identification and assay of DPA assume a growing importance. The following experiences deal with the influence of a hitherto little considered property of DPA in relation to those methods, namely, its chelation characteristics.

Pyridine carboxylic acids are well-known chelators (MARTELL and CALVIN 1952; TAMARI and KAJI 1952) and DPA (pyridine-2:6-dicarboxylic acid) is no exception. However, apparently the only specific information available on the chelation characteristics of DPA are the acid-base titration curves of the magnesium, calcium and copper complexes (POWELL and STRANGE 1956) and certain titration data on the relative stabilities of DPA complexes with several bivalent metals (SUZUKI and YANASAKI 1957). Spectrophotometric characterization of the absorption of light in the ultraviolet region by the chelates of DPA with a variety of metallic cations has been completed and will be reported elsewhere (SLEPECKY and FOSTER 1958).

Inasmuch as paper chromatography is a useful technique for isolation and characterization of DPA (PERRY and FOSTER 1955, 1956; KRISHNA MURTY and HALVORSON 1957), an aberrant chromatographic behavior of DPA traceable to its chelation capacity warrants description.

Methods

A. Preparation of spore extracts and chromatographic procedures. The only organic derivative of DPA thus far known to exist in spores is the small proportion of the monoethyl ester of DPA isolated from acid-hydrolyzed spores of *Bacillus cereus* var. *mycoides* (PERRY and FOSTER 1956). The object of the present experiments was to

* Professor Dr. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

** International Cooperation Administration Fellow, 1955—57. Present address: Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Weidel; Tübingen, Germany.

determine if milder conditions of hydrolysis of the spores would result in (1) recovery of a larger fraction of the total DPA as the monoethyl ester, and (2) detection of other ethersoluble combined forms of DPA.

Several different species of aerobic spore-forming bacteria were grown and allowed to sporulate in media of different compositions. Aliquots of the various washed spore preparations were boiled for different times in various concentrations of H_2SO_4 in order to liberate maximal amounts of DPA from the spores. The strongest treatment was 15 min. boiling in $3\text{ N H}_2\text{SO}_4$ (PERRY and FOSTER 1956) and the mildest was 2 min. boiling in $0.1\text{ N H}_2\text{SO}_4$. Following hydrolysis, the solutions were neutralized with KOH and extracted with alkali-washed diethyl ether in a continuous liquid-liquid extractor. The aqueous solutions were then adjusted to $\text{pH } 1.0$ with H_2SO_4 and re-extracted with fresh alkali-washed diethyl ether. A small amount of water was added to the ether solution and the ether was removed by evaporation. These aqueous solutions were applied as spots to sheets of Whatman no. 1 filter paper. Each solution was chromatographed ascendingly in parallel with authentic DPA in 3 different solvent systems. The solvent systems employed were: Solvents A, diethyl ether-formic acid-water = 84:6:4 volumes, solvents B, *n*-butanol-methanol-acetic acid-water = 3:1:1:1 volumes, solvents C, ethyl acetate-acetic acid-water = 3:1:1 volumes. After being dried in a current of air at room temperature, the papers were examined for spots relatively opaque to ultraviolet light when viewed in a dark room.

B. *Preparation of pure authentic DPA.* The preparation of spectrophotometrically pure authentic DPA required some special precautions since it has been shown (SLEPECKY and FOSTER 1958) that specimens of crystalline DPA not specially purified may be sufficiently contaminated with chelated metals as to distort the ultraviolet absorption spectrum. Two procedures were employed with equally satisfactory results.

1. Commercial DPA was dissolved in $0.1\text{ N H}_2\text{SO}_4$ and extracted with alkali-washed diethyl ether. After evaporation of the ether, the residue was crystallized and recrystallized from water deionized by passage through ion exchange resins. The resistance of the deionized water was $> 10^6$ ohms.

2. Commercial DPA was dissolved in a minimal volume of 0.1 N HCl and crystallized from that solution. The product was dried *in vacuo* over NaOH pellets and the HCl-free material then recrystallized from deionized water. The colorless, needle-shaped crystals obtained in both cases melted at 229°C (capillary tube) (corrected, 236°C) with decomposition and liberation of CO_2 . A portion of the pure product held for 24 hours at 106°C lost no weight, indicating the absence of water of crystallization. The literature values for the melting point of DPA range from 226°C to 246°C (HESS and WISSING 1915, SOINE and BUCHDAHL 1950, POWELL 1953, BLACK, DEFF and CORSON 1949, MATHES, SAUERMLICH and KLEIN 1955, PLIML 1954, PERRY and FOSTER 1955, 1956).

Results

Chromatography in different solvent systems; ultraviolet absorption spectra of the material in the spots. In solvents A only a single ultraviolet-absorbing spot ($R_f = 0.75$) was observed on paper chromatograms of the spore extracts. In solvents B and C, however, the chromatograms from liberal applications of several spore extracts clearly showed the presence of at least three well-defined spots of about equal intensity, with different R_f values (Table 1). The different spots

from the extract of *B. megaterium* were cut out from the chromatograms, the cut-outs extracted with water and the ultraviolet absorption spectra of these solutions were determined in a model DU Beckman spectrophotometer (Fig.1). The middle spots from both chromatograms

Table 1. R_f values of ultraviolet-absorbing spots in spore extracts

	Solvents B	Solvents C
Slow-moving spots	0.19	0.28
Middle spot	0.35	0.41
Fast-moving spot	0.71	0.81
Authentic DPA (40 μ g) .	0.35	0.40

Solvents B. *n*-butanol-methanol-acetic acid-water = 3:1:1:1 volumes.

Solvents C. ethyl acetate-acetic acid-water = 3:1:1 volumes.

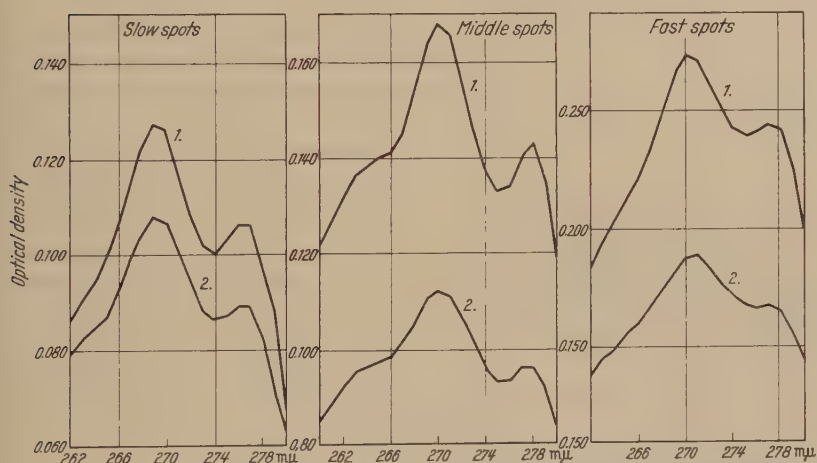


Fig. 1. Absorption spectra of eluates of the spots at different R_f values on chromatograms of an extract of spores of *Bacillus megaterium*. 1 Chromatogram developed in *n*-butanol-methanol-acetic acid-water (3:1:1:1 vols.); 2 Chromatogram developed in ethyl acetate-acetic acid-water (3:1:1 vols.)

have the same maxima at 264, 270 (principal) and 278 $m\mu$ as those reported for free DPA (PERRY and FOSTER 1956) and for calcium dipicolinate (POWELL 1953). However, the relative heights of the maxima at 278 and 270 $m\mu$ are much closer to those of calcium dipicolinate than of free DPA. The absorption spectra of the single spots in the chromatograms of authentic DPA in solvents B and C were virtually identical with those of the middle spots in Fig.1. Consequently, the middle spots in the spore extract chromatograms are assumed to be DPA.

At first, the slow- and the fast-moving ultraviolet absorbing spots from the spore extracts were regarded as different organic derivatives of DPA on account of (1) R_f values different from authentic DPA, (2) their

apparent absence in the chromatograms of the authentic DPA, and (3) their different though similar absorption spectra. Thus, the slow-moving spots had maxima at 269 and 276—277 $m\mu$ as compared to 270 and 278 $m\mu$ for the middle spot and for authentic DPA. Similarly, the fast-moving spots had maxima at 277 $m\mu$ and the ratios of absorbance at 270/278 were quite different from the corresponding ratios of authentic DPA.

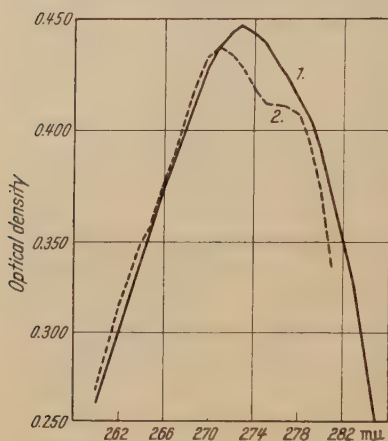


Fig. 2. Absorption spectra of dipicolinic acid in deionized water. 1 Unchromatographed, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 2 Eluate of fast-moving spots ($R_f = 0.73$) on a chromatogram of 150 μg dipicolinic acid developed in *n*-butanol-methanol-acetic acid-water (3 : 1 : 1 : 1 vols.)

fast-moving spot (R_f 0.73 in solvents B) in a chromatogram of authentic DPA was characterized by a considerable suppression of the secondary maximum at 278 $m\mu$ as compared to the spectra of the slow moving and the middle spots typified in Fig. 1. These properties approach those of unchromatographed DPA, which in deionized water has only suggestions of secondary maxima (Fig. 2).

Pure unchromatographed DPA has a single strong absorption maximum at 273 $m\mu$. Fig. 2 shows the distinct alteration in the absorption spectrum of the fast-moving spot from a chromatogram relatively overloaded with authentic DPA, as compared to the absorption spectrum of unchromatographed DPA. The principal maximum is shifted to 271 $m\mu$, a conspicuous secondary maximum is exhibited as a plateau at 275 to 278 $m\mu$, and a slight but definite inflection is evident at 264—265 $m\mu$. The shift in the principal maximum and the appearance of the 2 distinct secondary maxima at approximately 264 and 278 $m\mu$, respectively, are characteristic of several different metal chelates of DPA (SLEPECKY and FOSTER 1958), including the calcium chelate (POWELL 1953).

However, the following findings necessitated another interpretation of the apparent differences: (1) Rechromatography of aliquots of eluates of the fast-moving spots in solvents A, B and C revealed only one spot with the same R_f value as authentic DPA chromatographed in parallel. (2) The same result was obtained by spotting a smaller amount of the spore extracts than was used originally. (3) Multiple spots with virtually the same differences in R_f values and with absorption spectra similar to those in Fig. 1 could be obtained by chromatographing authentic DPA in larger amounts than previously employed, i. e., approximately 150 μg per application. As an example of (3), the absorption spectrum (Figure 2) of the

Compared to the absorption spectrum of the specially purified DPA shown in Fig. 2, previously published curves for the absorption spectrum of free DPA (POWELL 1953; PERRY and FOSTER 1956) are somewhat inaccurate; they undoubtedly reflect the content of a proportion of one or more metal chelates of DPA.

It may be concluded that the paper chromatographic separating of spore extracts into several different ultra-violet-absorbing spots was not due to the presence of a mixture of combined and free DPA, but rather that the movement of DPA was influenced markedly by metal contaminants in the paper, forming DPA chelates which show distinct differences in chromatographic and spectrophotometric behavior.

A satisfactory explanation for the fact that only one spot is obtained in solvents A, and 3 spots in solvents B and C, is not altogether apparent. A possible explanation may be in the fact that formic acid (in solvents A) is a considerably stronger acid ($K = 1.76 \times 10^{-4}$) than acetic acid (in solvents B and C) ($K = 0.75 \times 10^{-5}$). Increased hydrogen ion concentration displaces metals from chelates (MARTELL and CALVIN 1952) and it may well be that solvents A favors the free acid condition of DPA by suppressing its chelation.

No evidence has been found for the presence of significant amounts of organic derivatives of DPA in spores extracted under the mildest conditions mentioned above. This conclusion was independently corroborated after the completion of this work by experiments in which a possible decomposition of bound forms of DPA by acid and by heat were excluded. Thus, the water-soluble portion of spores of *B. cereus* var. *mycoides* disrupted mechanically in water at 5°C contains at least 97 per cent of the DPA of the spores in a dialyzable form indistinguishable from free DPA (RODE and FOSTER 1956).

Paper chromatographic behavior of authentic DPA. If less than approximately 100 μ of spectrophotometrically pure DPA was applied as a spot in the chromatographic systems described above, essentially all the DPA was converted to chelate by available metal(s) in the paper and it migrated as a single spot. If approximately 150 μ g or more of DPA was applied as a spot, some free DPA moved well ahead of the chelated DPA, and formed a distinctive short streak, leaving chelated DPA behind as it combined with metal impurities during its movement up the paper. Enough metal impurities were present to bind two successive portions of the DPA as chelates. Even the fastest moving spot was partially a chelate of DPA; in all probability, the succession of distinct spots would have continued had the solvent present progressed further on a longer paper.

This interpretation was verified by an experiment which used a sheet of Whatman no. 1 paper that was pretreated to remove the free metal

contaminants. The paper was washed for 36 hours with a solution of 0.1 per cent sodium versenate (Na ethylenediamine tetraacetate). The wash liquid was frequently stirred and replaced by fresh liquid. Next the paper was washed with deionized water until it was versene-free and then dried in air. Spots containing 40, 70 and 160 μg , respectively, of pure DPA were applied to the purified paper, and the chromatogram developed in solvents B. In contrast to all previous experience with unpurified

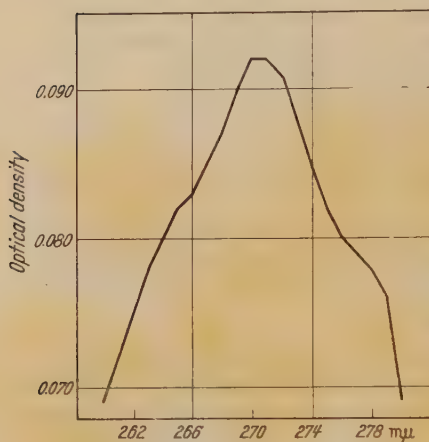


Abb. 3

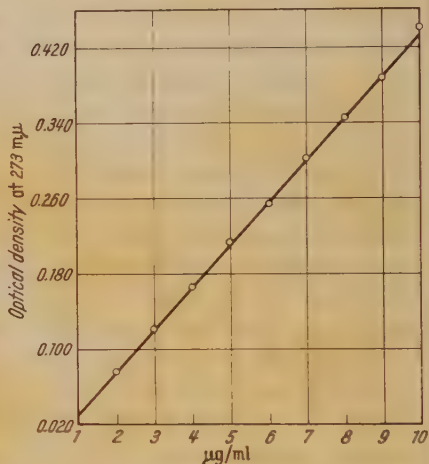


Abb. 4

Fig. 3. Absorption spectrum of dipicolinic acid eluted from the one spot (R_f 0.76) on a chromatogram prepared from 40 μg dipicolinic acid. The Whatman no. 1 paper was pre-washed with Na ethylenediamine tetraacetate (versene) to remove metal impurities. Chromatogram developed in *n*-butanol-methanol-acetic acid-water (3 : 1 : 1 : 1 vols.)

Fig. 4. Standard curve of absorbance at 273 $m\mu$ of known concentrations of unchromatographed dipicolinic acid in deionized water

paper developed in solvents B, only a single ultraviolet-absorbing spot ($R_f = 0.76$) was detected for all three concentrations of DPA. The absorption spectrum (Fig. 3) of the material in eluates of the spots resembled the spectra of the previously described fast-moving spots (R_f 0.71, Fig. 2) on overloaded, unwashed paper. Even so, the secondary peaks at 265 and 278 $m\mu$ were not abolished completely, pointing up the difficulty of fully eliminating metal contaminants in this procedure.

The above results, together with other similar experiences, make it clear that the metal content of chromatographic paper decisively influences the chromatographic behavior of DPA in certain solvent systems and alters by chelation the ultraviolet absorption spectra of the eluted spots.

Quantitative assay of DPA. For a quantitative spectrophotometric assay of DPA it is, therefore, important to exclude rigorously all unwanted chelating metals. This is especially true since the maximal specific absorbance is different for various metal chelates of DPA (SLEPECKY and FOSTER 1958). Acidic ether extracts of spores prepared by heating suspensions of spores in water or dilute acid as described by PERRY and FOSTER (1956) were found to be sufficiently free from metals and from other materials with significant absorption in the ultraviolet region of the spectrum that they could be used directly for spectrophotometric assay. A small amount of deionized water was added to the ether solutions, and after evaporation of the ether, the absorbance was measured at $273\text{ m}\mu$, the absorption maximum of non-chelated free DPA. Figure 4 shows the linear response in a standard curve of absorbance of known amounts of DPA treated according to the above procedure. It is obvious that this procedure provides an accurate assay of DPA. It eliminates certain disadvantageous operations essential in other assays of DPA (PERRY and FOSTER 1955; JANSSEN et al. 1958). Its sensitivity is about 10 times greater than the colorimetric procedure based on the ferrous-DPA complex (JANSSEN et al. 1958), thereby permitting the analysis of correspondingly smaller amounts of samples.

The value of discussions with Dr. R. A. SLEPECKY and Dr. L. J. RODE is gratefully acknowledged.

This work was supported in part by the Office of Naval Research, by the Atomic Energy Commission and by the American Cancer Society.

Summary

Paper chromatography of $100\text{ }\mu\text{g}$ or more of dipicolinic acid (DPA) in acetic acid-containing solvents resulted in 3 distinct ultraviolet-absorbing spots at different R_f values. The ultraviolet absorption spectra of eluates of the respective spots were different; this is ascribed to metal chelates of DPA. As DPA moves up the paper, it chelates with metal impurities in the chromatographic paper. The chelates have lower R_f values than free DPA which is the fastest moving spot. This condition arises only when the amount of DPA exceeds the chelation capacity of metal impurities in the system. Chromatographic paper pre-washed with Na ethylenediamine tetraacetate to remove the metal impurities gave only a single spot. Chromatography in a formic acid-containing solvent did not produce the chelate spots. A possible explanation is advanced for this behavior. A sensitive, simple spectrophotometric assay of DPA is described based on optical density at the wave length of maximal absorption of DPA, $273\text{ m}\mu$.

References

- BLACK, G., E. DEPP and B. D. CORSON: *J. Org. Chem.* **14**, 1421 (1949).
HESS, K., and F. WISSING: *Ber. dtsch. chem. Ges.* **48**, 1907—1912 (1915).
JANSSEN, F. W., A. J. LUND and L. E. ANDERSON: *Science* **1958**, 26—27.
KRISHNA MURTY, G. G., and H. O. HALVORSON: *J. Bact.* **73**, 235—240 (1957).
MARTELL, A. E., and M. CALVIN: *Chemistry of the Metal Chelate Compounds*. New York: Prentice-Hall 1952. — MATHES, W., W. SAUERMILCH and T. KLEIN: *Ber. dtsch. chem. Ges.* **86**, 584—588 (1953).
PERRY, J. J., and J. W. FOSTER: *J. Bact.* **69**, 337—346 (1955); **72**, 295—300 (1956). — PLIML, J.: *Chem. Listy* **48**, 869—872 (1954); cited in *Chem. Abstr.* **49**, 9665 (1955). — POWELL, J. F.: *Biochemic. J.* **54**, 210—211 (1953). — POWELL, J. R., and R. E. STRANGE: *Biochemic. J.* **63**, 661—668 (1956).
RODE, L. J., and J. W. FOSTER: Unpublished experiments (1956).
SLEPECKY, R. A., and J. W. FOSTER: Manuscript in preparation (1958). — SOINE, T. O., and M. R. BUCHDAHL: *J. Amer. pharm. Ass., sci. Ed.* **39**, 421 (1950). — SUZUKI, K., and K. YANASAKI: *Naturwissenschaften* **44**, 396 (1957).
TAMARI, E., and J. KAJI: *J. Agr. Chem. Soc. (Japan)* **26**, 223—306 (1952). — TINELLI, R.: *Ann. Inst. Pasteur* **88**, 212—226 (1955).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Die Wirkung der Bestrahlung mit ultravioletem Licht auf Mikroorganismen, untersucht an Einzell-Kulturen*

Von

R. MEYER und K. MEYER-PIETSCHMANN

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Mai 1958)

Bei der unübersehbaren Fülle radiobiologischer Untersuchungen gibt es verhältnismäßig wenige, die sich mit der Wirkung von Bestrahlungen auf isolierte Individuen von Mikroorganismen befassen. Das ist bei der Kleinheit der Mikroorganismen durchaus begreiflich. Ein Teil dieser Organismen, soweit ihre Größe nämlich unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskopes für sichtbares Licht liegt, scheidet von vornherein aus. Aber auch kleinere Bakterien bieten technisch beträchtliche Schwierigkeiten, und selbst noch bei größeren Mikroorganismen ist ein erheblicher technischer Aufwand erforderlich, wenn es sich darum handelt, eine größere Anzahl von diesen in Einzell-Kulturen zu ziehen und sie in ihrer Nachkommenschaft einzeln genetisch zu verfolgen. Im Gegensatz zu den statistischen Methoden, wie sie z. B. bei der Untersuchung der Dosis-Effekt-Kurve angewandt werden, kann man hier bei geeigneter Versuchsanordnung jedes Individuum in seinem Verhalten unter dem Mikroskop studieren. Allerdings ist damit von vornherein der Anzahl der untersuchbaren Individuen eine ziemlich enge Grenze gezogen; damit ist der Anwendungsbereich einer solchen Methode auf bestimmte Fragestellungen beschränkt.

Für die im folgenden mitgeteilten Versuche wurden die Einzell-Kulturen mit Hilfe der Barberschen Pipette am Mikromanipulator hergestellt und auf Lindnerschen Hängetrophen gezogen. Manche dieser Tropfen wurden später auf Kulturröhrchen oder Kulturschalen übertragen. Für den Augenblick der Bestrahlung wurde das Deckgläschen mit dem Lindnerschen Tropfen auf ein Quarztragglas mit Ring gelegt; sonst wurden die üblichen Hohlsliffobjektträger verwendet. Als Strahlungsquelle diente der Cadmiumfunke der Köhlerschen mikrophotographischen Einrichtung für ultraviolettes Licht. Mit Hilfe eines Monochromators kann man bei diesem Gerät die gewünschte Wellenlänge einstellen. Für unsere Versuche wurde ausschließlich die Wellenlänge $\lambda = 257 \text{ m}\mu$ verwendet, in deren Nähe die DNS ein starkes Absorptionsmaximum hat. Das Köhlersche Gerät erlaubt, die Fokussierung und Bestrahlung des Objektes unter mikroskopischer Kontrolle vorzunehmen. Dies ist notwendig, da eine merkliche Aberration des Quarzkondensors

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. RIPPPEL zum 70. Geburtstag gewidmet.

dieser Apparatur eine sorgfältige Fokussierung der Strahlungsquelle, eine genaue Ortung des zu bestrahlenden Objektes mit Hilfe einer Okularmarke und die Berücksichtigung der Streuung der Dicke der einzelnen Hängetropfen erfordert. Durch eine geeignete Markierungsmethode war ein schnelles Auffinden der Einzelzelle möglich, so daß der ganze Prozeß der Isolierung, Übertragung auf den Quarzobjektträger, Bestrahlung und Rückübertragung auf den gewöhnlichen Objektträger im Mittel etwa 3 min je Individuum beanspruchte. Dadurch war es möglich, an einem Tage etwa 100 Einzell-Kulturen herzustellen und zu bestrahlen. Bei fast allen Versuchen wurden außerdem unbestrahlte Einzell-Kulturen als Kontrollen mitgeführt. Die Einzelzelle befand sich auf der Nährbodenoberfläche, so daß sie unmittelbar den Strahlen ausgesetzt und nicht von Flüssigkeit umgeben war. Als Nährsubstrate dienten für Bakterien Bouillon-Agar, für Pilze Würze-Agar¹. Durch Vorversuche wurde festgestellt, daß eine Vorbestrahlung dieser Nährböden mit der von uns verwendeten Strahlendosis keinen Einfluß auf die Entwicklung unbestrahlter Organismen hatte. Auf technische Einzelheiten soll in einem späteren Bericht eingegangen werden.

Für unsere Versuche wurde die Bestrahlungsdosis nach Möglichkeit so gewählt, daß etwa die Hälfte der Individuen überlebte, während die andere Hälfte letal geschädigt wurde: es wurde — wenn man das so ansehen will — nur ein Punkt der Dosis-Effekt-Kurve ausgewählt. Natürlich konnte eine solche Dosis nicht genau eingehalten werden. So ergaben z.B. zwei an *Oospora lactis* ausgeführte Versuche die folgenden Zahlen: von 93 bzw. 94 Individuen waren nach der Bestrahlung 55 bzw. 38 letal geschädigt und 38 bzw. 56 überlebend. Von diesen letzteren entwickelten sich 30 bzw. 52 normal, dagegen wiesen 8 bzw. 4 Anomalien in der Entwicklung auf. Diesen letzteren haben wir unsere besondere Aufmerksamkeit zugewandt. Die Beobachtungen mußten sich aus Zeitgründen auf leicht erfaßbare morphologische Merkmale beschränken, obwohl vielleicht physiologische Veränderungen ein größeres Interesse hätten beanspruchen können. In einer Reihe von Fällen konnten jedoch cytologische Untersuchungen ergänzend vorgenommen werden.

Als Versuchsobjekte dienten Bakterien und Pilze.

In diesem Bericht soll nur einiges über die Beobachtungen an *Oospora lactis* mitgeteilt werden, während die Mitteilung über die anderen Mikroorganismen und Literatur einem späteren Bericht vorbehalten bleiben soll. Die Ausgangskultur dieses Pilzes wurde der Sammlung des Institutes entnommen. Von dieser Kultur wurde eine Reihe von Einspor-Kulturen hergestellt und in zwei orientierenden Versuchsreihen zunächst die geeignete (vgl. oben) Bestrahlungszeit für dieses Objekt zu 1 sec bestimmt, die für alle Versuche beibehalten wurde. Von einer der bei diesen beiden Versuchsreihen mitgeführten nichtbestrahlten Einspor-Kulturen ausgehend wurden dann die weiteren Bestrahlungsversuche durchgeführt.

Nach den Literaturangaben schwanken die Eigenschaften von *Oospora lactis* etwas; die morphologischen Eigenschaften werden auch durch die Zusammensetzung des Nährsubstrates beeinflußt. Der Pilz entwickelt vegetativ Sporen mit einer verstärkten Membran, die meistens kurzzyllindrisch, mitunter etwas ellipsoidisch oder würfel- bis kugelförmig sind. In der Literatur wird angegeben (z. B. DELITSCH), daß diese Sporen durch Abschnürung an den Hyphenenden entstehen, so daß die an der Basis befindlichen Sporen die jüngsten seien. Das entspricht nicht, oder doch nicht immer, dem wirklichen Verhalten. Vielmehr ist es in der Regel so, daß sich zunächst größere Stücke abschnüren, die auch mehrere Kerne enthalten. Diese Stücke zerfallen dann nach und nach, indem sie sich an den bereits vorher gebildeten Scheidewänden trennen, ohne daß eine bestimmte Reihenfolge zu erkennen ist, nach welcher die Trennung an den einzelnen Querwänden erfolgt. Bei der Trennung

¹ Aus Malz der Städtischen Brauerei, Göttingen.

wölben sich infolge Turgors die Enden der Sporen kalottenartig vor; dies geschieht zuweilen so plötzlich, daß die dabei sich trennenden Sporen ein kurzes Stück fortgeschneilt werden. Die kleinsten Abschnitte enthalten einen oder zwei Kerne; es ist aber nicht ohne weiteres zu erkennen, welches die einkernigen, und welches die zweikernigen Sporen sind.

Die Bestrahlung der Spore von *Oospora lactis* mit Ultraviolett von $\lambda = 257 \text{ m}\mu$ kann, wie bereits erwähnt, für diese dreierlei Folgen haben:

1. Hat die Bestrahlung letal gewirkt, so tritt oft gar keine weitere Veränderung der Spore ein; nach einiger Zeit bilden sich im Inneren der Spore meist Granula. Mitunter verändert sich die Spore nach der Bestrahlung noch ein wenig, stellt aber, meist nach Austritt von Zellinhalt, ihre Lebenstätigkeit bald ein. In anderen Fällen entwickelt sich noch ein kurzer Keimschlauch oder gar ein kleines verzweigtes Hyphenstück, die aber dann, ebenfalls meist unter Austritt von Zellinhalt, schnell zugrunde gehen.

2. Bei den überlebenden Individuen tritt in den meisten Fällen zwar eine normale Entwicklung ein, aber — wenigstens anfangs — mit einer Verzögerung. Seltener treten bei den Überlebenden zu Beginn Wachstumsanomalien auf, die aber noch während des Wachstums auf dem Hängetropfen verschwinden, so daß man später das Mycel nicht mehr von dem einer unbestrahlten Kontrolle unterscheiden kann.

3. Nur in verhältnismäßig wenigen Fällen (vgl. oben S. 180) sind diese Wachstumsanomalien so beständig, daß sie auch noch an den unbestrahlten Subkulturen von bestrahlten Kulturen nachgewiesen werden können. Diese Anomalien sind aber immer mehr oder weniger labil und pflegen sich von Subkultur zu Subkultur allmählich zu verändern. Zum Studium dieser Veränderungen wurden von vorbestrahlten Kulturen, meist schon vom Hängetropfen aus, Einspor-Subkulturen angelegt. Wegen der Labilität der Anomalien wollen wir bei diesen nicht von „Mutationen“ sprechen, obwohl wegen der verwendeten Wellenlänge mit gelegentlichen Veränderungen der Gene gerechnet werden muß. Aber es ist nicht von der Hand zu weisen, daß daneben noch andere Faktoren am Zustandekommen der Anomalien mitwirken können. Im allgemeinen ist im Verlaufe der aufeinander folgenden Einspor-Subkulturen eine Tendenz zur Rückentwicklung auf die normale Form hin zu erkennen. In keinem Falle war es möglich, eine bestimmte aufgetretene Anomalie über beliebig viele Einspor-Subkulturen hinweg zu erhalten. Ganz aussichtslos wäre natürlich der Versuch, eine solche Kultur in der sonst üblichen Weise etwa durch Überimpfen von Kulturröhrchen zu Kulturröhrchen mit der Platinnadel unverändert erhalten zu wollen; hier würden die langsamer regenerierenden Hyphen sehr bald von den schneller regenerierenden überwuchert werden.

Die morphologischen Veränderungen im einzelnen, die nach der Bestrahlung auftreten, sind ähnlich, wie sie an den Zellen der verschiedensten Objekte beobachtet worden sind: Blasenbildung (Abb. 11—14),

Teilungsstörungen, Austritt von Zellinhalt (Abb. 9) u. a.; es braucht mit dem Auftreten dieser Anomalien die Lebenstätigkeit der Zelle nicht eingestellt zu werden (vgl. unten). Bei *Oospora* treten zuweilen Anschwellungen an den Zellenden auf (Abb. 1); oder man kann die Bildung auffallend verschieden großer Sporen am gleichen Mycel feststellen. In

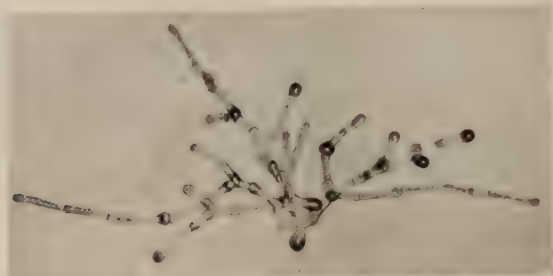


Abb. 1. *Oospora lactis*. Angeschwollene Zellenden. Fünfte Einzell-Subkultur nach Bestrahlung. 96 Std. alt. Vergr. 200mal



Abb. 2. *Oospora lactis*. Veränderte Anordnung der Sporen. Achte Einzell-Subkultur. 432 Std. alt. Vergr. 200mal



Abb. 3. *Oospora lactis*. Veränderte Anordnung der Sporen. Neunte Einzell-Subkultur. 216 Std. alt. Vergr. 100mal

geringerem Ausmaß kommen Größenschwankungen der Sporen allerdings auch bei unbestrahltem Mycel vor. Infolge der Teilungsanomalien ergibt sich gelegentlich eine veränderte Anordnung der Sporen an den Hyphen (Abb. 2 u. 3); auf den ersten Blick kann man dabei an eine Fremdinfektion denken; indessen weist eine Einsporkultur von einem solchen Mycel leicht aus, daß es sich um *Oospora lactis* handelt.

Es sei in diesem Zusammenhang nur beiläufig erwähnt, daß bei der Isolierung mit der Barberschen Pipette kaum mit einer Fremdinfektion gerechnet zu werden braucht; bei den von uns im Laufe dieser Bestrahlungsversuche hergestellten nahezu 18 000 Isolierungen haben wir keine Fremdinfektion durch die Pipette selbst erhalten.

Wenn im Verlaufe der späteren Entwicklung der Einzell-Kultur eine solche (selten) auftrat, rührte sie stets von solchen Manipulationen her, die für die Herstellung der Lindnerschen Tröpfchenkultur üblich sind.

Auch in der späteren Entwicklung auf dem Hängetropfen lassen Mycelien von bestrahlten Sporen Anomalien erkennen.

Während die unbestrahlten Kontrollen hier ein lockeres und ziemlich unregelmäßiges Hyphengeflecht bilden, findet man bei den bestrahlten Kulturen oder deren Subkulturen relativ häufig eine mehr oder weniger dichte Lagerung der Hyphen, vor allem in der Mitte des Mycels,

mit der oft eine strahlige Anordnung der Randhyphen verbunden ist (Abb.4). Bei manchen dieser Mycelien erhält sich dieser Wachstumscharakter auch in den Subkulturen längere Zeit, bei anderen bricht aber irgendwann plötzlich aus dem strahligen Rande ein unregelmäßiges Hyphengeflecht hervor; und zwar geschieht dies um so häufiger, um eine je spätere Subkultur seit der Bestrahlung es sich handelt. Eine andere Abnormität zeigt Abb.5: hier hat ein kleines Mycel auf dem Hängetropfen zwar die unregelmäßige Anordnung der Hyphen einer unbestrahlten Kultur; aber bis zum Augenblick der Aufnahme

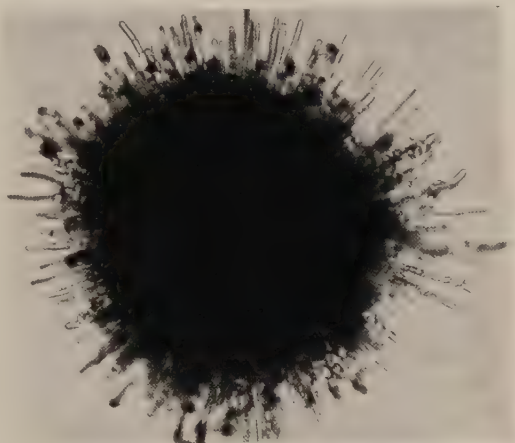


Abb. 4. *Oospora lactis*. Kompaktes Mycel mit strahligen Randhyphen, auf Hängetropfen. Vierte Einzell-Subkultur nach Bestrahlung. 90 Std alt. Vergr. 135 mal

war es mit Ausnahme eines „Busches“ (im Bilde dunkel) mit der Sporenbildung zurückgeblieben. Auf der Kulturplatte hat diese Kultur nicht, wie man vielleicht erwarten möchte, ein Makromycel mit Sektorenbildung erzeugt, sondern der Unterschied in der Sporenbildung war nur zeitlich. Die auf den Hängetropfen mit radiärer Anordnung der Randhyphen gewachsenen Mycelien entwickeln sich auf der Kulturschale meist zu einem klumpigen Makromycel; erst nach mehreren Wochen entsteht um den Klumpen herum ein Rasen, wie er für die unbestrahlte Kultur eigentümlich ist, ein Zeichen für die allmähliche Regeneration.

Zur cytologischen Untersuchung des Materials wurden die bestrahlten und unbestrahlten Hyphen bzw. Mycelien in umfangreichere Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Fixierungsmittel wie Sublimat-Alkohol, Chromsäure-Osmiumsäuregemische nach CHAMPY und nach FLEMMING-HEITZ und Osmiumsäuredampf unter Verwendung der Feulgenschen Nuklealreaktion und Färbemethoden auf Pilze, Hefen und Bakterien mit einbezogen. Es waren natürlich nur Stichproben (etwa 5%) unter dem gesamten anfallenden bestrahlten Material möglich.

Die größeren Mycelien wurden so, wie sie als Agar-Hängetropfenpräparate gewachsen waren, mit dem Deckglas in die Fixierungsflüssigkeit in Zimmermannschälchen

gebracht oder über kleinen Gefäßen mit Osmiumsäuredampf behandelt. In den Flüssigkeiten löste sich das Agartröpfchen von selbst vom Deckglas und wurde durch die weiteren verschiedenen Flüssigkeiten mit Hilfe eines kleinen Platinspatels übertragen. Die Hydrolyse in $n\text{-HCl}$ von 60°C wurde in kleinen, mit Korkstopfen versehenen Glasröhrchen von etwa 4 cm Länge und $\frac{3}{4}$ cm Durchmesser, die im Wasserbad auf 60°C vorgewärmt waren, vorgenommen. Die Mycelien wurden nach der Hydrolyse, wobei sich das Agarplättchen meistens auflöste, in ebensolche Röhrchen mit fuchsin-schwefliger Säure übertragen, in Zimmermannschälchen mit SO_2 -Wasser



Abb. 5

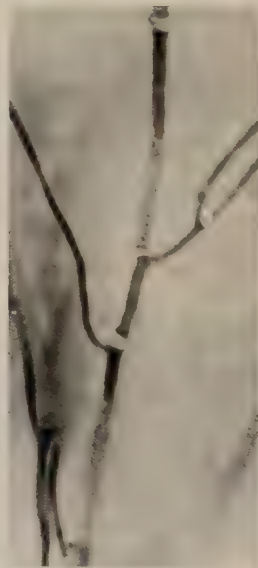


Abb. 6

Abb. 5. *Oospora lactis*. Versporter Hyphenast in sporenfreiem Mycel. Dritte Einzell-Subkultur. 93 Std alt. Vergr. 15mal

Abb. 6. *Oospora lactis*. Kontrolle, 4 sec Ultrarot. 46 Std alt. Osmiumsäuredampf. 70% iger Alkohol, GIEMSA 1 : 33 (ohne Hydrolyse). Vergr. 500mal

gründlich gewaschen, in Wasser gespült und in Glyceringelatine eingeschlossen. Bei den ersten Präparaten hatte es sich gezeigt, daß Einschuß und mikroskopische Beobachtung mit Ölinnersion in Glycerin *allein* für die empfindlichen Mycelien ungeeignet ist. Die Glycerin-Gelatine hat aber gegenüber Glycerin den Nachteil, der sich allerdings erst nach längerer Zeit herausstellte, daß die Farbe, die bei der positiven Nuklealreaktion entsteht, angegriffen wird und allmählich ganz verblaßt, während z. B. die Giemsa-Färbung und sogar die Fettfärbung mit Sudan III, die am unfixierten Material vorgenommen wurde, noch nach 5 Jahren vollständig unverändert erhalten geblieben ist¹. Diejenigen Mycelien, die wegen ihrer Kleinheit auf dem Agartröpfchen nicht makroskopisch sichtbar waren, wurden unter der Präparierlupe mit Hilfe eines kleinen Platinspatels, oder, wo dieser zu grob war, mit Pipetten unter ständiger Kontrolle durch die verschiedenen Präparationsflüssigkeiten, in Zimmermannschälchen oder Uhrgläschen, geführt.

¹ Es wird vermutet, daß das Phenol diejenige Komponente der Glyceringelatine ist, die den bei der Feulgenreaktion synthetisierten Farbstoff angreift.

Schon während dieser Übertragungen der Mycelien zeigte sich ein verschieden gearteter Bestrahlungseinfluß auf den Zusammenhalt der Mycelien.

Am wenigsten zerbrechlich waren die im Zentrum kompakt gewachsenen Mycelien mit radiär geordneten Randhyphen (Abb. 4). Bei locker, aber auch noch strahlig gewachsenen Mycelien löste sich das Mycel zuweilen in die einzelnen verzweigten Ästchen auf (Abb. 5), die sich als solche weiter behandeln lassen und verschiedene Präparierung ein und desselben Mycels ermöglichen. Die Mycelien aus den Hyphen mit angeschwollenen Zellenden (Abb. 1) zerfallen sehr leicht an den gelenkartig aussehenden Stellen; auch normale Scheidewände kommen in diesem Mycel vor. Ein anderes Mycel, das mit Osmiumsäuredampf, 70%igem Alkohol und Giemsa-färbung ohne Hydrolyse behandelt und als Kontrolle 4 sec mit Ultrarot¹ bestrahlt worden war, zeigt oberhalb der Verzweigungen leichte symmetrische Auftreibungen. Da das Protoplasma hier nicht hineinreicht, kann man die Scheidewand als feine Linie erkennen (Abb. 6). Das Präparat zeigt also, daß diese Stellen im Mycel, die bei den Hyphen mit angeschwollenen Zellenden in so charakteristischer Weise verändert sind, zu morphologischen Veränderungen auch im nicht mit Ultraviolett bestrahlten Material neigen können.

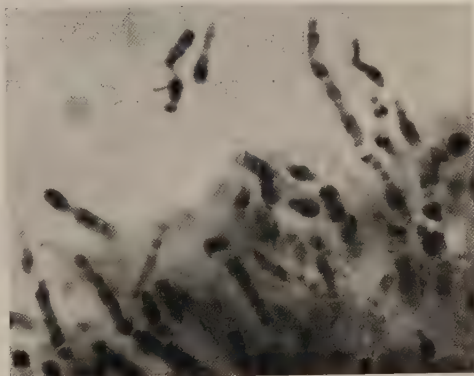


Abb. 7. *Oospora lactis*. Siebente Einzell-Subkultur nach der Bestrahlung. 430 Std alt. FLEMMING-HEITZ 1 Std, Dimedon-Alkohol, FEULGEN, Vergr. 560 mal

Außer diesen Beeinflussungen der Mycelform finden sich auch Unterschiede in der Membran- und Protoplasmabeschaffenheit der Hyphen bei bestrahltem Material. Im allgemeinen zeigen die Hyphen in wechselndem Grade eine mehr oder weniger früh einsetzende Verfettung, die sich bei allen Osmiumsäure-haltigen Fixierungsmitteln, sowohl mit Lösungen (Abb. 7) wie in Dampfform (Abb. 8), wie auch vital mit Sudan III nachweisen ließ. Die starke Verfettung verdeckt infolge der Grau- bis Schwarzfärbung des Fettes leicht die Feulgen-positive violette Färbung der Kerne und Kernfragmente. Das Protoplasma wird graurötlich angefärbt, und die Räume zwischen Membran und Protoplasma (Abb. 7) können rötlich erscheinen, je nach der Länge der Einwirkung des Fixierungsmittels. Im Gegensatz zu anderen untersuchten Pilzen färbte sich bei *Oospora* die Membran nicht fuchsinrot. Nach Sublimat-Alkohol.

¹ Es konnte in hier nicht mitgeteilten Versuchen festgestellt werden, daß kurze Ultrarotbestrahlung (Schwerpunkt 800 m μ) sonst weder auf die mit Ultraviolett vorbestrahlten noch auf die unbestrahlten Sporen einen merklichen Einfluß hatte. Die „reaktivierende Strahlung“ (KELNER, DULBECCO) im Bereich von 300—500 m μ wurde in unsere Versuche nicht einbezogen.

Fixierung wurden die besten Kerndarstellungen in ungefärbtem Protoplasma erhalten. Die Feulgenreaktion zeigt den Einfluß der Bestrahlung auf die Kernsubstanz in zweifacher Hinsicht: einmal finden sich pyknotische Kerne mit intensiver Anfärbung; andererseits kann in Mycelien mit teilweiser Schädigung bestimmter Bereiche, die am Austritt von

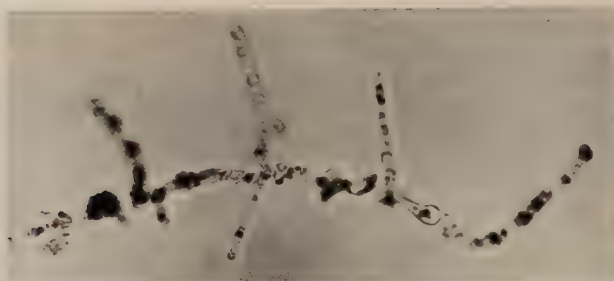


Abb. 8. *Oospora lactis*. Zehnte Einzell-Subkultur nach der Bestrahlung. 145 Std alt. Sublimat-Alkohol, Dimedon-Alkohol, FEULGEN. Vergr. 280mal

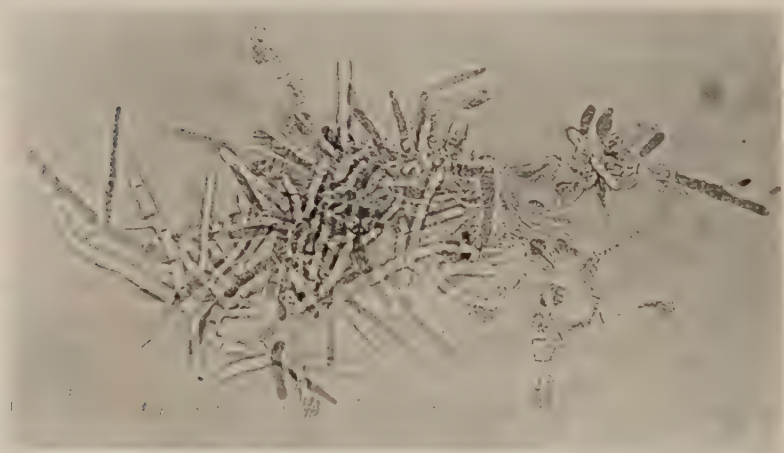


Abb. 9. *Oospora lactis*. Dritte Einzell-Subkultur nach der Bestrahlung. 100 Std alt. Sublimat-Alkohol, FEULGEN. Vergr. 280mal

Zellinhalt und „leeren“ Zellen zu erkennen sind (Abb.9), eine normale Kernfärbung in den weiterwachsenden Mycelteilen und eine granulいたte Anfärbung von Kernresten im detritusartigen Austritt von Zellinhalt vorkommen. Die auf frühen Wachstumsstadien stehen gebliebenen Mycelien, wie z. B. Fäden mit stark geschädigtem Zellinhalt oder stark verfettete kleine Mycelien mit keuligen Deformationen (Abb.8) enthalten nur noch ganz blaß gefärbte oder gar nicht mehr Feulgen-positiv reagierende Kerne.

Im normalen Mycel kann man beobachten, daß die oben bereits geschilderte Oidienbildung an geraden Seitenzweigen der sich oft dichotom verzweigenden Hyphen erfolgt. In den erwähnten größeren

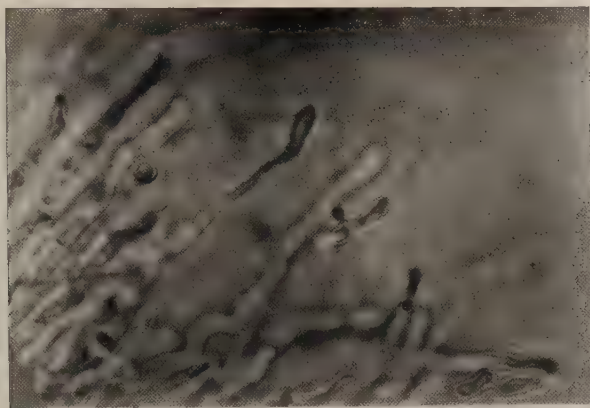


Abb. 10. *Oospora lactis*. Siebente Einzel-Subkultur nach der Bestrahlung. 200 Std alt. Sublimat-Alkohol, Dimedon-Alkohol, FEULGEN. Vergr. 560mal

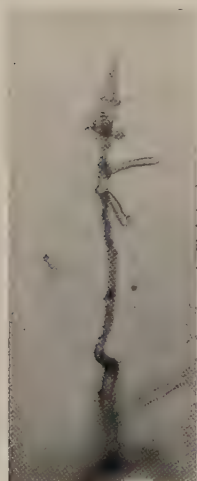


Abb. 11



Abb. 12

Abb. 11. *Oospora lactis*. Direkt bestrahlte Spore. 48 Std alt. Vergr. 180mal

Abb. 12. *Oospora lactis*. Direkt bestrahlte Spore. 70 Std alt. Vergr. 160mal

Mycelabschnitten, aus denen Oidien entstehen, kommt es wiederholt vor, daß in Zellen mit z. B. 8 Kernen einer dieser Kerne pyknotisch ist, während die anderen normal aussehen. Auch abgetrennte Oidien können einen pyknotischen Kern haben. An den Hyphen der Mycelien mit gedrungenem Wuchs ist die Oidienbildung offenbar gehemmt, vielleicht

durch eine Veränderung der Beschaffenheit der Hyphenmembran und der Abschnürung der Oidien von der Hyphe. Die Hyphen sind an ihrem distalen Ende wie schräg abgeschnitten (Abb. 10) und werden im weiteren Verlauf stiefelartig gestaltet (Abb. 10 links). Während der Inhalt der



Abb. 13

Abb. 13. *Oospora lactis*. Direkt bestrahlte Spore. 95 Std alt. Vergr. 160mal

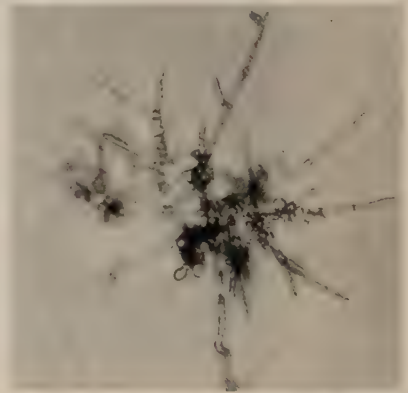


Abb. 14

Abb. 14. *Oospora lactis*. Direkt bestrahlte Spore. 120 Std alt. Vergr. 140mal

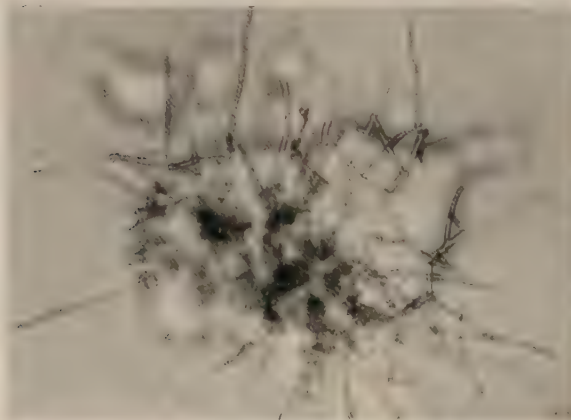


Abb. 15. *Oospora lactis*. Direkt bestrahlte Spore. 140 Std alt. Vergr. 130mal

Stiefelspitze ein sich einschnürendes, die Membran nicht ausfüllendes Protoplasma zeigt, kann der Inhalt des Stiefelschaftes auch schon wie in oidienartige Portionen sanduhrartig abgeteilt sein (Abb. 7). Dabei mag die starke Verfettung nicht ohne Einfluß sein. Es werden bei diesen Hyphen anscheinend keine Oidienketten, sondern immer zur Zeit nur 1—2 Zellen mit je einem Kern abgeteilt. Diese Oidien stehen dann

rechtwinklig oder schräg zur Längsachse der hier abgelenkt erscheinenden Hyphe (Abb. 7 u. 10). Die Hyphenmembran erscheint verdickt. Andere strahlige Mycelien sind im ganzen viel zarter gewachsen; die Hyphen sind stark fettig degeneriert und außen am Mycel entsteht auf einem Hyphenende mehr oder weniger excentrisch ein Wirtel von gesunder aussehenden, Oidien bildenden Zellen. Diese Anordnung erinnert zuweilen an die Konidienträger bei *Penicillium* (Abb. 2).

Um eine Aussage über etwaige Veränderungen des Kernteilungsvorganges machen zu können, hätte zuvor unbestrahltes Material, etwa nach der Methode von ROBINOW¹ eingehend untersucht werden müssen, was nicht im Rahmen dieser Arbeit lag. So ließ sich cytologisch nur allgemein ein Einfluß der vorgenommenen Bestrahlung auf die Feulgen-positive Kernsubstanz, auf die Mycelbildung (Form des Mycels, Austritt von Zellinhalt) und auf die Oidienbildung feststellen.

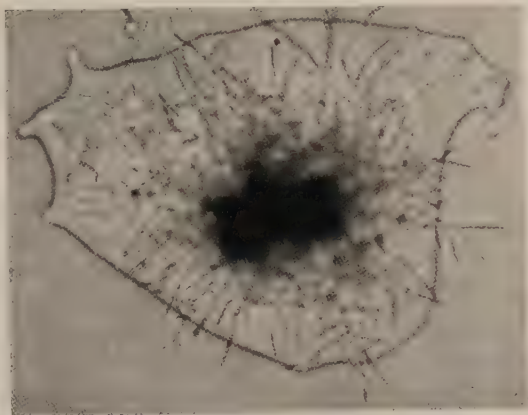


Abb. 16. *Oospora lactis*. Direkt bestrahlte Spore. 170 Std. alt. Vergr. 55 mal

Die Abb. 11—16 zeigen die zeitliche Entwicklung einer direkt bestrahlten Spore.

Die frühesten Stadien konnten hier photographisch nicht erfaßt werden, da man einer bestrahlten Spore nicht von vornherein ansehen kann, wie sie sich nach der Bestrahlung verhalten wird. Es ist daher schon ein besonders glücklicher Zufall, wenn es gelingt, wenigstens einige Stadien von sich abnorm entwickelnden Mycelien photographisch festzuhalten.

Bei dem ersten erfaßten Stadium, 48 Std. nach der Bestrahlung (Abb. 11), haben wir ein etwas verzweigtes Hyphenstück mit einer Kröpfung, welches an einem Ende Blasen gebildet hat. Letztlich ist nun aber nicht dieses Ende mit den Blasen, sondern das normal erscheinende mit der Kröpfung. Gerade von dem blasigen Ende geht ein Impuls zur Weiterentwicklung aus, und nach 70 Std. (Abb. 12) sind hier neue Zweige entstanden. Mit der Zeit geht die Blasenbildung, die nach 95 und 120 Std. noch deutlich zu erkennen (Abb. 13 u. 14), nach 140 Std. aber nur noch angedeutet ist (Abb. 15), zurück und ist nach 170 Std. von ziemlich normalen Hyphen überdeckt (Abb. 16). Auch bei anderen Pilzen, z. B. *Rhizopus nigricans*, konnte die Feststellung gemacht werden, daß gerade von einer Blasenbildung her die Regeneration des Mycels ausgeht.

¹ Can. J. Microbiol. 3, 771 und 791 (1957).

Indessen geht die Entwicklung hier im Vergleich zu einer unbestrahlten Spore viel langsamer vor sich.

Bei einer unbestrahlten Spore einer Kontrolle konnte z. B. nach 21 Std beginnende Verzweigung des Keimschlauches festgestellt werden; nach 30 Std hat das lockere Mycel bereits einen Durchmesser von 2,4 mm erreicht, nach 51 Std setzt Sporenbildung ein, und nach 90 Std ist das Mycel weitgehend versport und bedeckt den ganzen Hängetropfen (Durchmesser etwa 6 mm).

Zusammenfassung

Es wird über Versuche berichtet, in denen Sporen von *Oospora lactis* einzeln mit ultravioletem Licht von der Wellenlänge $257\text{ m}\mu$ bestrahlt und auch einzeln in ihrem weiteren Schicksal verfolgt wurden. Die Dosis wurde so gewählt, daß etwa die Hälfte der 90—100 bestrahlten Individuen überlebte, die andere Hälfte letal geschädigt wurde. Ein kleiner Anteil der so bestrahlten Individuen zeigte Wachstumsanomalien, die längere Zeit, auch über mehrere Einzell-Subkulturen hinweg, erhalten blieben, aber schließlich auf normale Formen hin regenerierten. Entsprechend den gefundenen Wachstumsanomalien ließen sich cytologisch teilweise Veränderungen der Kernsubstanz (Kernpyknose, Kernzerfall), des Protoplasmas (Verfettung, Hydratation) und der Hyphenmembran (Deformationen an den Zellengrenzen und Hyphenenden, Behinderung der Oidienbildung und -abschnürung) nachweisen.

Ausgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

(From the Institute of Microbiology, Uppsala 7)

Studies concerning Swedish ropy milk

The antibiotic qualities of ropy milk*

By

RAGNAR NILSSON and GERDA NILSSON

With 2 figures in the text

(Eingegangen am 19. April 1958)

As early as 1933 WHITEHEAD showed that certain lactic acid forming *Streptococci* produced an antibiotic active against other *Streptococci*. OXFORD (1944) showed that this antibiotic substance, diplococcin, was protein in nature. This antibiotic has not aroused much interest, perhaps mainly owing to the fact that the organisms most sensitive to diplococcin are streptococci that can in practice hardly be differentiated from the organisms producing it. A good deal more attention has been paid to the antibiotic nisin, studied and isolated by MATTICK and HIRSCH (1944), which is also produced by lactic acid forming *Streptococci*. Nisin inhibits different types of microorganisms, such as *Pneumococci*, *Staphylococci*, *Clostridium*, and *Mycobacterium tuberculosis*. RITTER (1956) has shown certain *Lactobacilli* to have an antibiotic effect on bacteria belonging to the *Coli-Aerogenes* group. On the other hand he has not been able to find any such antibiotic effect regarding *Str. lactis* or *Str. thermophilus*.

During the last ten years investigations concerning the characteristics of Swedish ropy milk have been carried out at this Institute. The first part of these investigations comprised attempts to establish the composition of the bacterial flora in this type of fermented milk. Thus NILSSON (1950) was able to show that the slime-producing, lactic-acid-forming *Streptococcus* was a strain the characteristics of which, with the exception of the slime-producing property, were all identical with those of *Str. lactis*. This strain was therefore named *Str. lactis longi*. This variant was found to form about 60% of the microbial flora of Swedish ropy milk, the rest consisting of non-slime-producing lactic-acid-forming *Streptococci* and *Oospora lactis*. Experiments were carried out to verify Linnaeus's assertion that ropy milk can be obtained by adding leaves of *Pinguicula vulgaris* to milk. *Pinguicula* from different parts of the country was collected, and the bacterial flora that appeared when this plant was kept in

* Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

sterile milk was studied. It was shown that the surface of *Pinguicula* was always covered by a bacterial flora containing *Alcaligenes viscosum*, but never *Str. lactis longi*.

Another interesting observation was that ropy milk kept much longer than ordinary fermented milk cultivated under the same conditions. The ropy milk retained its mildly sour taste and its acidity for more than a month, whereas the sour milk gradually became overgrown with mould, its degree of acidity decreasing and the milk turning yellow and foul-tasting.

The last named observations formed the subject of a special study by G. NILSSON and R. NILSSON (1955), in which it was shown that the slime-forming *Str. lactis longi* was antagonistic to a large number of different fungi.

The present work records the results obtained in continued studies of the antibiotic properties of ropy milk. Another aspect regarding the characteristics of this type of milk, the dietetic one, is also touched upon, but this will be treated in more detail in a later paper in collaboration with Dr. Herbert ENELL, M. D.

Material and methods

In the above mentioned paper (G. NILSSON and R. NILSSON 1955) concerning the antibiotic qualities of *Str. lactis longi* different fungi were used as test organisms. There was, however, a possibility that the inhibiting effect on these organisms might be due to exclusion of air, owing to enveloping of spores by the slime. In the present study the antibiotic effect of *Str. lactis longi* has therefore been tested on both aerobic (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) and anerobic (*Clostridium*) microorganisms.

In experiments where *Staph. aureus* and *Esch. coli* were used as test organisms these were cultivated together with *Str. lactis longi* or alternatively with slime prepared from a ropy milk culture (precipitation from milk serum with alcohol, solution in water, adjusted to pH 4.6, and renewed filtration). The cultures were incubated at 37° C. Aerobic and anaerobic series were carried out. As media 10 ml tryptone-glucose broth were used. In these experiments 2000—3000 test cells were inoculated, and 1/2 ml of a one-day-old culture of *Str. lactis longi* was added. The development of the test organisms was determined by plating *Esch. coli* on violet-red-bile agar and *Staph. aureus* on blood agar. When studying the antibiotic effect of the isolated slime the same method was used, except that the *Str. lactis longi* culture was replaced by slime. To each tube was added 0.25 g of slime in aqueous solution.

The medium for *Clostridium* was 10 ml tryptone-glucose-agar. This medium was inoculated with 1/2 ml of a broth culture of test organisms in broth-dilutions of 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000, and 1/100,000. 1/2 ml of a one-day-old culture of *Str. lactis longi* was also added to each tube. The tubes were sealed for anaerobic cultivation and kept at 37° C, where upon gas-production in the tubes was followed.

The methods used in experiments to purify the slime and determine its chemical nature are described on page 194.

Results and discussion

The antibiotic effect of *Str. lactis longi* and of the slime on *Staph. aureus* and *Esch. coli* are illustrated in table 1.

The results show that *Str. lactis longi* has an inhibitory effect on *Staph. aureus* and *Esch. coli*, which appears during both aerobic and anaerobic cultivation. The effect of the slime is relatively weak. The inhibition of bacterial growth seen in the slime series does not seem to be fortuitous, however, since it was repeatedly observed.

Table 1. Number of bacteria in tryptone-glucose broth after incubation for 2 days at 37° C together with either *Str. lactis longi* or slime from this organism, under aerobic and anaerobic conditions

Addition to the broth	Test organism			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	aerobic	anaerobic	aerobic	anaerobic
—	10 ¹³	10 ¹⁵	10 ¹⁸	10 ¹⁷
<i>Str. lactis longi</i>	10 ⁷	10 ⁷	10 ¹³	10 ¹¹
Slime	10 ¹²	10 ¹²	10 ¹³	10 ¹⁵

The above test organisms are aerobic. As previously mentioned, experiments have also been carried out to examine the antibiotic effect on an obligate anaerobe, a *Clostridium* strain being then used.

In order to establish whether the inhibitory effect might be partly due to the lactic acid produced by *Str. lactis longi*, one series of tubes in this experiment was inoculated with a non-slime-producing strain of *Str. lactis*. Experiments were also carried out in which *Str. lactis longi* was replaced by isolated slime in an amount corresponding to that used in the previous experiments. The results of such an experiment are given in table 2 and fig. 1.

Table 2. Growth of *Clostridium* incubated together with *Str. lactis longi*, *Str. lactis* or slime from *Str. lactis longi* for 5 days at 37° C

Concentration of <i>Clostridium</i> culture	No addition	<i>Str. lactis longi</i>	<i>Str. lactis</i>	Slime
1/10	+	—	+	+
1/100	+	—	+	+
1/1.000	+	—	+	(+)
1/10.000	+	—	+	—
1/100.000	—	—	—	—

+ development of gas + + very strong development of gas

As is seen from both table 2 and fig. 1, both *Str. lactis longi* and the slime produced by this organism have an inhibitory effect on *Clostridium*.

Str. lactis, on the other hand, did not influence the growth of the test organism. The slime slightly inhibited the butyric acid bacteria.

The gradual production of gas was evident over a period of several days. In the presence of the *Str. lactis longi* culture no gas developed.

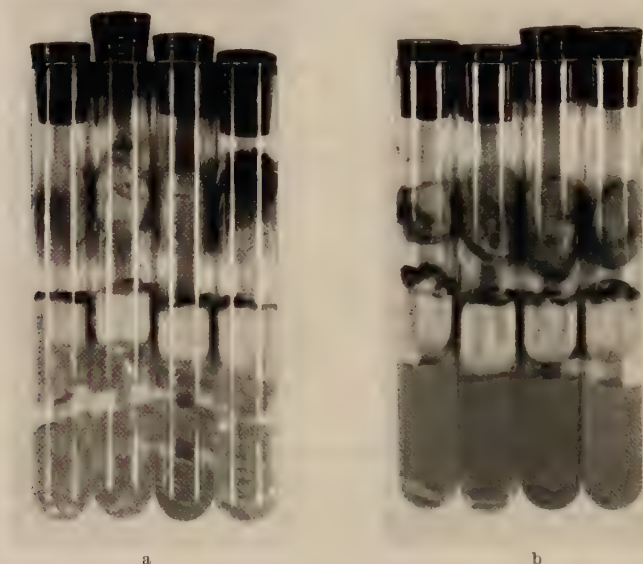


Fig. 1. a Dilution series of *Clostridium* incubated alone at 37° C. for nine days. b Dilution series of *Clostridium* incubated together with *Streptococcus lactis longi* at 37° C. for nine days

Table 3 shows the day-to-day gas production in the presence of *Str. lactis longi* or slime.

Table 3. Development of gas by *Clostridium* in the presence of *Str. lactis longi* and slime respectively. Incubated at 37° C

Concentration of <i>Clostridium</i> culture	Time in days																	
	1	2	3	4	6	9	1	2	3	4	6	9	1	2	3	4	6	9
	No addition						<i>Str. lactis longi</i>						Slime					
1/100	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
1/1,000	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	+	+
1/10,000	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
1/100,000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

The chemical character of the slime substance

Mechanical isolation and subsequent purification of a slime substance chiefly formed when the slime-producing microorganisms grow in milk is very difficult. The slime is found together with and surrounding the microorganisms that have produced

it and from which it can hardly be entirely separated. Further, it is mixed with the different carbohydrates and protein substances of the milk itself. For these reasons the experiments made by us so far to obtain information regarding the chemical composition of the slime cannot claim to be based on studies of a pure substance, but appear to have a certain interest in spite of these drawbacks. Though different precipitation and purification processes have been used to purify the substance it can further not be excluded that the antibiotic substance may be combined or bound up with the slime substance, the slime itself being inert.

The most common types of slime produced by bacteria are mucins and the gums dextran, laevolan and galactan. The *mucins* are precipitated by weak acids, are insoluble in distilled water, soluble in weak alkalis, and are decomposed on boiling with weak acids into a protein body and a reducing substance. *Dextran* is precipitated by ethanol, is soluble in water, and is produced only from sucrose. On hydrolysis it breaks down to form glucose. *Laevulan* is precipitated by lead acetate, is soluble in water, and is said to be produced only from sucrose. On hydrolysis it breaks down to form fructose. *Galactan* is precipitated by ethanol, is not soluble but swells in water, and will after hydrolysis yield galactose.

The ropy substance of Finnish ropy milk, a milk that seems to be identical with the type produced in Sweden, has been investigated by SUNDMAN (1953) by paper chromatography. She maintains that the slime, in contrast to many other streptococcal slimes, is a protein which after hydrolysis does not differ strikingly from that of hydrolysed casein.

The purification of the slime investigated by us was carried out in the following manner:

Skimmed milk which had been heated for 1 hour in a boiling water-bath, and then allowed to cool, was inoculated with a ropy milk culture, and then stored at room temperature for 2 days. The ropy milk thus obtained was centrifuged for 20 min in an angle centrifuge, in order to separate off the milk proteins.

From the ropy milk serum thus obtained the slime was precipitated with the same volume of 96% ethanol. The slime was collected on filter paper, dried in air, and then dissolved in water acidified to pH 4.6 in order to prevent any remaining milk proteins from dissolving as well. The solution was refiltered, and the slime precipitated with alcohol from the clear viscous filtrate. The precipitate was air-dried on filterpaper, finally forming a white, amorphous powder, which dissolved in water slightly acidified with HCl to form a tough, ropy, clear solution.

The preparation contained 2.8% N. After hydrolysis and chromatographic analyses by MOORE and STEIN's method the results shown on fig. 2 were obtained.

As is seen from the diagram, the amino-acid mixture obtained after hydrolysis does not agree with that in a hydrolysate of milk proteins, for which reason it does not seem possible to explain the nitrogen content in the preparation as being due to pollution with such a protein. In addition the following characteristics were noted.

The slime did not reduce FEHLING's solution. After hydrolysis, paper chromatography (solvent, butanol-acetic acid; indicator, aniline hydrogen phthalate) still revealed no sugars.

It was found that the isolated slime was not directly comparable to bacterial slimes of known character (mucin, laevulan, dextran, galactan). It is similar to some of them in being precipitated by alcohol and being water-soluble; but it also contains nitrogen, and according to the Biuret test and Heller's test for protein which were both positive, it contains a protein.

The gums may be conveniently grouped according to the sugar to which they are hydrolysed on boiling with acid. As a matter of fact it

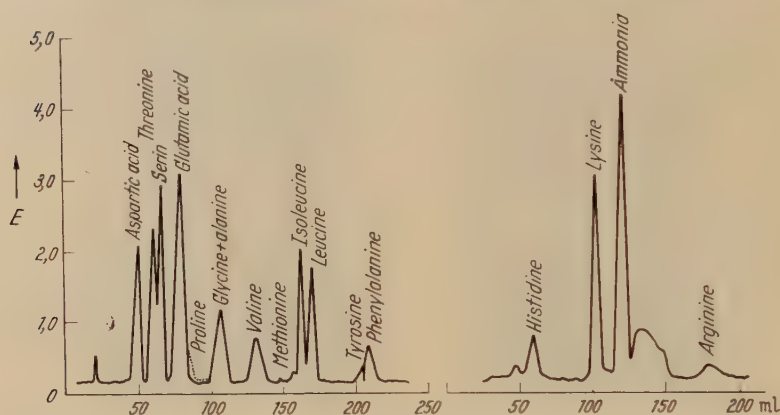


Fig. 2.

Colorimetric readings in the quantitative analyses of amino acid content in hydrolysate of the slime¹

¹ We are obliged to Miss F. WAGENBERG for skilful help in the amino-acid analyses.

was not possible to demonstrate fructose, glucose, galactose, or lactose after hydrolysis in the slime here studied. Concerning the other group of slime substances, the mucins, the micro-organisms producing these are characterized by their need for combined nitrogen in the substrate. This is also the case concerning *Str. lactis longi*, which thrives on such media as milk or peptone solutions. The slime here in question contains a protein. But the N content is only 2.8%, and therefore are some sort of carbohydrate, not yielding reducing sugar on hydrolysis, seems to be bound to this protein. In a previous paper it has been tentatively suggested that the dietetic property ascribed to this milk may be connected with the possible presence of galacturonic acid. However, paper chromatography revealed neither d-galacturonic acid nor d-glucuronic acid in the slime. But a fluorescent spot was obtained in the hydrolysed sample, the nature of which has not yet been possible to explain.

Concerning the antibiotic properties of *Str. lactis longi* the following may be noted. In experiments reported earlier in this paper it was observed that

the test organisms were more or less inhibited by a slime prepared according to methods described above. In a series of tests carried out during an earlier stage of this investigation, where different fungi were used as test organisms, it appeared that the antibiotic effect of a culture of *Str. lactis longi* was destroyed by heating. In this way the antibiotic substance differs from nisin. After sterile filtration the antibiotic effect is found in the filtrate. When, finally, a culture has been dialysed, the antibiotic effect remains in the dialysis remains. The antibiotic substance may be formed when *Str. lactis longi* is cultivated in a broth containing one of the sugars glucose, lactose, or galactose. In fact, a certain antibiotic effect may be observed even in broth not containing sugar.

The dietetic qualities of ropy milk

As was mentioned in the introduction, Swedish ropy milk in different connections has been pointed out as interesting from the dietetic point of view. In collaboration with Dr. H. ENEL we have therefore planned a more exhaustive study of these qualities, and investigations were started at the Boden Military Hospital during the Autumn of 1957. In a future paper the results of this work will be described.

Summary

Str. lactis longi has been found to possess inhibitory properties against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and a *Clostridium* strain. The composition of the slime produced by *Str. lactis longi* has been studied.

References

- MATTICK, A. T. R., and A. HIRSCH: Nature (Lond.) **154**, 551 (1944). — NILSSON, G.: Svenska Mejeritidningen **38** (1950). — NILSSON, G., and R. NILSSON: Ann. Acad. Sci. fenn., Ser. A, II. Chemica, 235 (1955). — OXFORD, A. E.: Biochem. J. **38**, 178 (1944). — RITTER, P.: Schweizerische Milchzeitung (Wissensch. Beil.) **35**, 273 (1956). — SUNDMAN, V.: VI Congr. Intern. Microbiol. Roma, 997 (1953). — WHITEHEAD, H. R.: Biochem. J. **27**, 793 (1933).

(From the Department of Bacteriology, State Laboratory for Soil and Crop Research,
Lyngby, Denmark)

Calcium requirements of *Azotobacter**

By

J. R. NORRIS** and H. L. JENSEN

(Eingegangen am 16. April 1958)

Although a number of workers have studied the calcium requirements of *Azotobacter* species, there is still considerable disagreement on several points, especially over the question of the dispensability of calcium when growth occurs in the presence of combined nitrogen.

KRZEMIENIEWSKA (1910) demonstrated a calcium requirement of 0.36 mg./g. of glucose used for *Azotobacter chroococcum* growing in a medium containing humic acid but no fixed nitrogen. According to STAPP and RUSCHMANN (1924) calcium had little or no effect on the growth of *Azotobacter* in the presence of nitrate and SCHRÖDER (1932) also concluded that calcium was not essential for the growth of *A. chroococcum* on fixed nitrogen, although the cation did have a stimulatory effect.

BURK and his coworkers (BURK and LINEWEAVER 1931, HORNER and BURK 1934) performed a thorough investigation into the requirements of *A. vinelandii* and *A. chroococcum* for calcium and strontium. Basing their observations partly on turbidimetric and partly on respirometric data they concluded that calcium was essential only for active nitrogen fixation and that it could be replaced by combined nitrogen. Maximum growth of *A. vinelandii* required 20—50 p. p. m. of calcium, and strontium was slightly less efficient when compared on a molar basis. Later however BURK and HORNER (1940) and BURK and BURRIS (1941) reversed their earlier opinions stating that calcium was required in equal amounts for growth on free or fixed nitrogen. BIRCH-HIRSCHFELD (1932) also failed to demonstrate the essentiality of calcium for growth of *A. chroococcum* in media containing fixed nitrogen but BORTELS (1936) was unable to confirm this and emphasised the importance of using cells grown on calcium-deficient media as inoculum. STEINBERG (1938) found calcium to be needed for growth of *A. chroococcum* in the presence or absence of nitrate.

More recently RADLER (1955) obtained maximum growth of *A. chroococcum* with 12 mg. CaCO_3 /100 ml. but suboptimal growth with 3 mg./100 ml. in the absence of fixed nitrogen. ESPOSITO and WILSON (1956a and b, 1957) working with *A. vinelandii*, were able to replace calcium (needed for fixation of free nitrogen) by ammonium acetate and demonstrated that calcium was involved in the synthesis of metaphosphate by whole cells. These authors were also able to replace calcium in nitrogen-free medium by sodium acetate, ethyl alcohol or potassium malate plus sucrose.

Much of the earlier confusion undoubtedly arose through the use of unsuitable media and through failure to effect an adequate removal of calcium during their preparation. Most of the work to date has involved

* Professor Dr. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

** Present address: Department of Science Bacteriology, University of Glasgow, Anderson College, 56 Dumbarton Road, Glasgow, W. 1.

only two species; *A. chroococcum* and *A. vinelandii*, and it was considered desirable to perform a more thorough assay of the calcium requirements of representative strains of all the *Azotobacter* species using more recently available experimental techniques.

I. Methods

Laboratory strains of *Azotobacter* and *Beijerinckia*, obtained from various sources, were used:

A. agile: V. J., K, S, 9, 132; *A. vinelandii*: M2, W. O. (Wilson's strain), 1819, D; *A. chroococcum*: 210, 211, 01568, 3747; *A. beijerinckii*: T, L. H. 1; *A. insigne*: V. J. 2, V. J. 5, V. J. 8; *A. agile* 533; *A. macrocytogenes*: L. H. 2(0), 2.

Beijerinckia sp. (probably *B. indica*) A., B.

Two media were used throughout the investigation:

Basal Medium: Glucose 2.0%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.0005%. The glucose and phosphate were dissolved together and the solution shaken with activated charcoal (5 g. Norite/litre) and filtered before the addition of the other constituents. Chemicals of A. R. grade and distilled water purified by passage through Amberlite resin (IR 120-H) were used throughout.

BURK'S sucrose medium (BURK and LINEWEAVER 1931): Sucrose 2.0%, K_2HPO_4 0.065%, KH_2PO_4 0.016%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, NaCl 0.02%, $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 9H_2O$ 0.0005%, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ Trace. This medium was prepared with the same precautions as was the basal medium. Control experiments showed these two media to be deficient only in calcium ion. The media were prepared at 5/4 concentration and dispensed in 20 ml. amounts into 300 ml. Erlenmeyer flasks, calcium or strontium being added as required in the form of the chlorides dissolved in 5 ml. amounts of purified distilled water at appropriate concentrations. The flasks were plugged with cotton wool and autoclaved at 110° C for 15 min. All glassware was cleaned with hot nitric acid and carefully rinsed, first with ordinary and then with purified distilled water. Flasks were inoculated with one drop of a thin purified water suspension of organisms harvested from a 2 day culture grown on calcium deficient, nitrogen free medium (basal medium solidified with 2% agar) and incubated at 25° C on a rotary shaker. Good growth was normally obtained in 48–72 hours (c. f. DUDA, 1956).

Nitrogen determinations, either on the whole cultures or on washed cell deposits were performed by the Kjeldahl method.

II. Experimental Results

1. Calcium requirements in the absence of combined nitrogen

Nitrogen determinations were made on cultures grown for 48–72 hours in basal medium containing various concentrations of calcium. Representative results are presented in Table 1. Calcium was required for the growth of *A. vinelandii* (4 strains), *A. chroococcum* (4 strains), *A. insigne* (4 strains), and *A. beijerinckii* (2 strains).

A. agile (5 strains) grew in the complete absence of calcium although growth was stimulated by the presence of the cation. The degree of stimulation varied considerably with the different strains of this organism, being most pronounced with *A. agile* S. (Table 2). After serial passage for 5 transfers (1–2–2–2–1 days) in calcium free basal

Table 1. Nitrogen fixation during growth in basal medium without combined nitrogen
(Range of amounts fixed by different strains in mg./25 ml. 48 hours incubation unless specified)

Species	Number of Strains	Calcium ion (p.p.m.)						
		0	0.4	1	2	4	10	20
<i>A. vinlandii</i>	2	0.0-0.1	0.1-1.7	0.4-2.0	2.3-2.5	3.5-4.0	3.8-4.6	4.0-4.8
	4	0.0-0.1	—	—	2.3-6.1	—	—	4.0-6.9
<i>A. chroococcum</i>	2	0.0-0.1	1.0-3.2	2.8-4.3	4.3-5.3	5.0-6.0	5.9-5.9	5.8-6.1
	4	0.0-0.1	—	—	2.1-5.3	—	—	5.8-7.3
<i>A. beijerinckii</i>	2	0.0-0.1	0.1-0.4	0.3-0.6	2.0-2.7	4.6-4.8	5.0-5.3	5.1-6.3
<i>A. insigne</i>	2	0.1-0.1	0.2-1.0	0.6-4.0	5.5-5.5	6.2-6.3	6.7-6.8	6.9-7.0
	4	0.0-0.1	—	—	2.2-5.5	—	—	6.1-7.0
<i>A. agile</i>	5	1.4-6.8	5.1-7.0	5.5-7.4	6.3-7.8	6.6-7.8	6.7-7.8	6.6-7.9
<i>A. macrocytogenes</i>	1	0.5	4.6	4.6	4.9	4.9	4.8	4.7
(72 hours incubation)	2	0.1-0.5	1.4-4.6	—	1.8-4.9	—	3.3-4.8	3.3-4.7

medium *A. agile* S became adapted to growth in the absence of calcium (Table 3).

A. macrocytogenes (2 strains) was capable of growing in the absence of calcium though at a very much slower rate than in its presence (Table 4).

Two strains of *Beijerinckia* sp. were tested for their ability to fix nitrogen in the absence of calcium, the inoculum consisting in this case of one drop of a 4 day culture in calcium-free basal medium. Table 5 shows the nitrogen fixed after 10 and 15 days' incubation. A very long lag period was noted (c. f. QUINNELL 1957 and SUTO 1957). The inhibitory effect of calcium is obvious and is even more pronounced than in earlier experiments with this genus (JENSEN 1954).

One strain of each of the species showing a need for calcium was tested in the basal medium for ability to utilise strontium. In each case strontium could replace calcium at approximately the same molar concentration (Table 6).

2. Calcium requirements in the presence of combined nitrogen

One strain of each of the species requiring calcium for growth on free nitrogen was tested for ability to dispense with the cation when provided with ammonium acetate at a

Table 2. *Nitrogen fixed (mg./25 ml.) during growth of A. agile S in basal medium with and without calcium*

Calcium	Incubation (days)		
	2	4	6
20 p. p. m.	7.3	—	—
None	0.7	4.0	5.2

Table 3. *Nitrogen fixed (mg./25 ml.) during growth of A. agile S in basal medium. (A — inoculum from an unpassaged culture, B — inoculum from a culture passaged five times in calcium-free medium. 48 hours incubation)*

	Calcium ion (p.p.m.)		
	0	2	20
A	1.1	7.6	7.7
B	6.9	7.3	7.6

Table 4. *Nitrogen fixed (mg./25 ml.) during growth of A. macrocytogenes in basal medium without added calcium*

	Incubation (days)		
	3	5	7
Strain L. H. 2(0)	0.4	1.9	2.0
Strain 2	0.0	1.9	1.8

Table 5. *Nitrogen fixed (mg./25 ml.) during growth of Beijerinckia sp. in basal medium (Strain A — 10 days incubation, Strain B — 15 days incubation)*

	Calcium ion (p.p.m.)		
	0	2	20
Strain A	5.5	5.5	2.4
Strain B	7.3	6.4	1.9

Table 6. *Nitrogen fixed (mg./25 ml.) during growth in basal medium (48 hours incubation unless specified)*

Species (strain)	Strontium ion (p. p. m. equivalents of calcium)		
	0	2	20
<i>A. vinelandii</i> (M. 2)	0.0	1.8	7.4
<i>A. chroococcum</i> (210)	0.0	0.3	5.3
<i>A. beijerinckii</i> (L. H. 1)	0.0	0.6	4.9
<i>A. insigne</i> (V. J. 2)	0.0	2.7	6.6
<i>A. macrocytogenes</i> (L.H.2(0)) (72 hours incubation)	0.0	4.4	5.8

concentration of 0.03 M. In each case calcium was needed at approximately the same concentration for growth with free or fixed nitrogen. Representative results are presented in Table 7.

Table 7. Cell nitrogen (in washed deposit mg./25 ml.) produced during growth in basal medium containing 0.03 M. ammonium acetate (48 hours incubation)

Species (strain)	Calcium ion (p. p. m.)						
	0	0.4	1	2	4	10	20
<i>A. vinelandii</i> (W. O.)	0.1	1.7	3.7	5.8	6.1	6.8	6.9
<i>A. vinelandii</i> (W. O.) (in BURK's medium)	0.1	—	—	6.6	—	—	6.9
<i>A. chroococcum</i> (210)	0.1	—	—	5.2	6.1	—	7.2
<i>A. beijerinckii</i> (L. H. 1)	0.0	—	—	0.4	1.6	—	6.5
<i>A. insigne</i> (V. J. 2)	0.1	—	—	4.1	5.4	—	6.1
<i>A. macrocytogenes</i> (L. H. 2(0))	0.1	—	—	4.0	4.5	—	5.0

Table 8. Nitrogen fixed (in nitrogen-free media) or cell nitrogen (in washed deposit from media containing ammonium acetate) in mg./25 ml. during growth in Burk's sucrose medium with and without addition of sodium (0.015 M) or ammonium (0.03 M) acetates (Incubation 48 hours unless specified)

Species (strain)	Calcium ion (p. p. m.)	Inoculum size (See text)				
		I.	II.	III.	I.	III.
	Added acetate	0	0	0	0	20
<i>A. vinelandii</i> (W. O.)	Sodium acetate	6.1	4.3	0.1	—	6.0
	None	—	—	—	2.9	—
	Ammonium acetate	8.1	0.2	0.0	—	8.2
<i>A. vinelandii</i> (M. 2)	Sodium acetate	5.6	0.1	0.0	—	8.5
	None	—	—	—	2.9	—
	Ammonium acetate	0.4	0.1	0.0	—	6.6
<i>A. chroococcum</i> (210)	Sodium acetate	3.9	0.0	0.0	—	6.6
	None	—	—	—	3.3	—
	Ammonium acetate	3.8	0.0	0.0	—	6.8
<i>A. beijerinckii</i> (L. H. 1)	Sodium acetate	0.1	0.1	0.1	—	6.2
	None	—	—	—	0.4	—
	Ammonium acetate	0.1	0.0	0.0	—	7.0
<i>A. insigne</i> (V. J. 5) (in glucose basal medium incubated 70 hours)	Sodium acetate	0.0	0.0	0.0	—	7.1
	None	—	—	—	0.0	—

These observations were clearly not in accordance with those of ESPOSITO and WILSON (1956a and b, 1957) and attempts were made to locate the cause of the discrepancy. Substitution of BURK's sucrose

medium (as used by the American workers) for basal medium did not affect the nature of the results and it was concluded that the only remaining variable was the size of the inoculum — much smaller in the present investigation than was frequently the case in the experiments of ESPOSITO and WILSON.

3. The influence of inoculum size on calcium requirement in the presence and absence of combined nitrogen

Inocula consisted of purified water suspensions of organisms grown on calcium and nitrogen deficient agar. In each experiment three inoculum sizes were used: "I" being of roughly the same order as was often used by the American workers (20–60 μg cell nitrogen by micro-Kjeldahl analysis), "II" one-tenth of this (2–6 μg cell nitrogen) and "III" one drop of dilute suspension (0.1–0.4 μg cell nitrogen). Typical results are to be seen in Table 8.

It is clear from these results that the apparent calcium sparing effects of sodium acetate (in the absence of fixed nitrogen) or of ammonium acetate are a function of the size of the initial inoculum and that such effects would not be manifest with the small inocula used throughout the present study. The figures also show that there was a significant carry over of calcium in the larger inocula but that this alone was insufficient to account for the calcium sparing effects observed.

An important point to emerge from these experiments was the difference in behaviour of the different species: thus *A. beijerinckii* L. H. 1 had a specific calcium requirement even when a medium containing sodium or ammonium acetate was heavily inoculated. *A. vinelandii* W. O. (the organism used by ESPOSITO and WILSON) showed sparing by both sodium and ammonium acetates with large inocula but another strain of this species (*A. vinelandii* M. 2) although behaving similarly with sodium acetate gave virtually no growth from large inocula in the presence of ammonium acetate.

III. Conclusions

The pattern of calcium requirements for the various species of *Azotobacter* in the absence of fixed nitrogen is in complete agreement with that obtained by WILSON (1957) using a method based on the turbidimetric determination of cell growth. The observation that a strain of *A. agile* (S) which grew poorly in the absence of calcium could readily be adapted to dispense with it is an interesting one indicating as it does the essentially labile nature of the calcium requirement of this species and providing an explanation of the variation observed in the behaviour of different strains.

The finding that calcium could be replaced by strontium at roughly the same molar concentrations was almost to be expected and is in

agreement with other observations (e. g. BURK and LINEWEAVER 1931, ESPOSITO and WILSON 1956a).

Whilst the inability of *Azotobacter* species to dispense with calcium in the presence of combined nitrogen is in agreement with the findings of some of the earlier workers, it is at variance with the observations of ESPOSITO and WILSON (1956a, 1957) who were able to replace calcium by either ammonium or sodium acetates. The results obtained by these workers are based largely on turbidimetric determinations of cell growth and relatively large inocula have been used e. g. "2% by volume of a 24 hour shake culture of *A. vinelandii* in BURK's medium whose calcium content is $0.6 \cdot 10^{-3} M$ " (ESPOSITO and WILSON 1957). It would seem from the data presented here that inoculum size is an important factor in this type of experiment. When very small inocula were used calcium could not be replaced by either sodium or ammonium acetates.

An interesting point arises from a consideration of the behaviour of *A. vinelandii* M. 2 (Table 8). This organism was able to grow from a large inoculum in a calcium-free medium containing sodium acetate but failed to grow in the presence of ammonium acetate under similar conditions. A possible explanation of this may lie in the observation of AZIM and ROBERTS (1955) that unadapted cells of *A. vinelandii* show a time lag in the uptake of ammonia nitrogen. In the absence of calcium this time lag may be long enough to mask the effect of the acetate.

Finally the difference in behaviour of *A. agile* and *A. insigne* should be noted. *A. insigne* (DERX 1951, VAGN JENSEN 1955) is very similar to *A. agile*, differing from it only in minor characteristics of which the most striking is perhaps the possession of polar flagella, and, it would now seem, in its requirement of calcium for growth. One of the strains of *A. insigne* used in the present work was received as a culture labelled "*A. agile* 533" and its true nature (later confirmed by VAGN JENSEN) was first indicated by its atypical calcium requirements. This was one of WINOGRADSKY's isolates and it would seem probable that a number of organisms circulating under the name of *A. agile* are, in fact, *A. insigne*.

Summary

Calcium was essential for the growth of *A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. beijerinckii* and *A. insigne* in the presence and absence of combined nitrogen. *A. agile* and *A. macrocytogenes* were able to grow in the absence of calcium but growth was stimulated by the cation.

Calcium could be replaced by strontium at roughly the same molar concentration.

The authors present evidence suggesting that the calcium sparing effect of ammonium and sodium acetates reported in the literature may be dependent on the size of inoculum used.

Our thanks are due to the late Professor A. J. KLUYVER, Professor P. W. WILSON, Professor JAN SMIT, Professor R. L. STARKEY, Professor D. J. JOHNSTONE, Dr. A. S. LOCHHEAD, Dr. Y. T. TCHAN and Mr. VAGN JENSEN for several strains of *A. vinelandii*, *A. agile* and *A. insigne*, and to Dr. JANE MEIKLEJOHN for the two strains of *Beijerinckii*. We also wish to thank Professor P. W. WILSON for communication of the data on calcium sparing effect in *A. vinelandii*.

One of us (J. R. N.) is indebted to the Yorkshire Agricultural Society for the award of a Travelling Fellowship.

References

- AZIM, M. A., and E. R. ROBERTS: *Biochim. biophys. Acta* **18**, 363—369 (1955). — BIRCH-HIRSCHFELD, L.: *Arch. Mikrobiol.* **3**, 341—361 (1932). — BORTELS, H.: *Zbl. Bakt., Abt. II.* **95**, 193—218 (1936). — BURK, D., and H. LINEWEAVER: *Arch. Mikrobiol.* **2**, 155—186 (1931). — BURK, D., and C. K. HORNER: *Proc. Third Intern. Congr. Microbiol.* New York, 489—490 (1940). — BURK, D., and R. H. BURRIS: *Ann. Rev. Biochem.* **10**, 587—618 (1941). — DERX, H. G.: *Proc. kon. ned. Akad. Wet.* **54**, 342—350 (1951). — DUDA, J.: *Acta microbiol. pol.* **5**, 113—115 (1956). — ESPOSITO, R. G., and P. W. WILSON: *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **93**, 564—567 (1956a). — *Biochim. biophys. Acta.* **22**, 186—187 (1956b). — Private Communication (1957). — HORNER, C. I., and D. BURK: *J. Agric. Res.* **48**, 981—995 (1934). — JENSEN, H. L.: *Acta agricult. scand. (Stockh.)* **4**, 224—236 (1954). — JENSEN, V.: *Botanisk Tidsskrift* **52**, 143—157 (1955). — KRZEMIENIEWSKA, H.: *Bull. int. Acad. Cracovie, Cl. Sci. math. nat. B*, 376—413 (1910). — QUINNELL, C. M.: *J. Bact.* **73**, 688—689 (1957). — RADLER, F.: *Arch. Mikrobiol.* **22**, 335—367 (1955). — SCHRÖDER, M.: *Zbl. Bakt., II. Abt.* **85**, 177—212 (1932). — STAPP, C., and G. RUSCHMANN: *Arb. biol. Reichsanst. Land- u. Forstw.* **13**, 305—368 (1924). — STEINBERG, R. A.: *J. Agric. Res.* **57**, 461—476 (1938). — SUTO, T.: *Tohoku J. Agr. Res.* **7**, 369—382 (1957). — WILSON, P. W.: Private communication (1957).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Beobachtungen des Wachstumsverhaltens von Streptomyceten auf Rossi-Cholodny-Aufwuchsplatten im Boden*

Von

NORBERT PFENNIG

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Mai 1958)

Unsere Bekanntschaft mit Streptomyceten beginnt zumeist mit der Betrachtung ihrer Erscheinungsform in Reinkulturen auf Agar-Schrägröhrchen. Von dorthier kennen wir sie in ihrer erfreuenden Farbenvielfältigkeit als eine durch typische, nur ihnen eigene Merkmale — wie z.B. ihren besonderen Erdgeruch und die verschiedenen Luftmyceltypen — gut charakterisierte Mikroorganismengruppe. Durch ihre Eigentümlichkeiten haben sie das Interesse vieler Beobachter angezogen, die sich mit ihren Besonderheiten zunächst durch das Studium solcher Kulturen intensiv vertraut gemacht haben (KRAINSKY 1914; WAKSMAN 1919, 1950; DRECHSLER 1919, LIESKE 1921, ORSKOV 1923, RIPPEL u. Mitarb. 1934; KRASSILNIKOV 1941). Zu einer auf diese Erkenntnisse aufgebauten mehr direkten Beobachtung ihres Daseins im Boden kam es erst durch die Methode der Aufwuchsplatten nach ROSSI (1927) und CHOLODNY (1930), da sich die von CONN (1917) und WINOGRADSKY (1925) angewandten direkten Methoden gerade für ein Auffinden von Streptomyceten im Boden wegen deren besonderen Eigenschaften als weniger geeignet erwiesen hatten (WINOGRADSKY 1925, CONN 1932).

Bereits in seiner ersten Arbeit über die neue Methode hebt CHOLODNY (1930) besonders hervor, wie häufig und gut er gerade Streptomyceten auf seinen Aufwuchsplatten finden konnte, und er gibt charakteristische Abbildungen, wie sie seitdem jeder mit seiner Methode erhalten kann. Andere Beobachter bestätigten später immer wieder die hinsichtlich der Streptomyceten von CHOLODNY gemachten Äußerungen (CONN 1932, DEMETER u. MÖSSEL 1933, HULPOI 1936, JENSEN 1933, 1934, 1943, MEYER 1935, 1950, vgl. auch RIPPEL 1933—1937, ERIKSON 1947, HOFF 1948, GIBSON 1957, TRIBE 1957, HENSSEN 1957). Aufwuchsplatten, welche zur Untersuchung mariner Bakterien von ZOBELL u. ALLEN (1935) im Meerwasser exponiert wurden, wiesen unter anderem auch vegetative und versporste Hyphen von Aktinomyceten auf. Anders als im festen Erdboden ergibt sich auf den Wuchsplatten im freien Wasser naturgemäß eine zu ihrer Umgebung mehr und mehr divergierende Entwicklung, da die — sonst fehlende — Aufwuchsmöglichkeit

* Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL, zum 70. Geburtstag in Dankbarkeit gewidmet.

innerhalb des freien Wassers einen Lebensraum mit eigenen, anderen Entwicklungsmöglichkeiten begründet (ZoBELL u. ALLEN 1935, JANNASCH 1955). Weitere Beschränkungen der Methode zeigten CONN (1932) und WINOGRADSKY (1949).

Die längere Beschäftigung mit physiologischen Eigentümlichkeiten und dem natürlichen Vorkommen von Streptomyceten-Stämmen (PFENNIG 1952, 1958; JAGNOW 1956) führte dazu, mehr von dem Dasein dieser Organismen im Boden selbst zu erkunden. Dabei wurde davon ausgegangen, hierfür die oft bemerkten Vorzüge der Aufwuchsplatten auszunutzen, zugleich aber weiteres über die Eigentümlichkeit dieser vielfach verwendeten Methode zu erfahren.

Methodik

Alle Untersuchungen wurden in einem kalkhaltigen, humosen Lehm Boden unter der Rasenfläche des Instituts Gartens (Ostseite des Hauses) vorgenommen, der sich durch einen für die Versuche genügend hohen natürlichen Streptomycetengehalt auszeichnete (10—20 Mycelien je 18×36 mm Deckglasfläche). Falls nicht besonders erwähnt, wurde methodisch ebenso vorgegangen wie bei CHOLODNY (1930) und MEYER (1950) beschrieben. Die aus dem Boden entnommenen Platten (je 2 vorher gut gereinigte Deckgläser 18×18 mm auf einem Objektträger) wurden nach dem Lufttrocknen direkt hitzefixiert (nicht abgespült) und anschließend mit Bengalrosa nach CONN (1929) 5 min über erhitztem Wasserbad gefärbt und in Caedax eingebettet. Alle Platten wurden systematisch ausgewertet auf einem mit Kreutzisch versehenen Zeiß-Standard-Mikroskop (Neofluar 10, 25, 45 und $100 \times$). Es wurde von der regelmäßigen Beobachtung ausgegangen, daß auf Bodenplatten, welche nach den Angaben von CHOLODNY und denen anderer bisheriger Untersucher 1—3 Wochen im Boden eingegraben waren, die meisten Streptomyces-Mycelien mit versporteten Lufthyphen und in Sporen fragmentierten vegetativen Hyphen ausgebildet waren und demgegenüber nur vereinzelt junges, vegetatives Mycel gefunden werden konnte. Deshalb wurde in mehreren Reihenversuchen dazu übergegangen, von zahlreichen zur gleichen Zeit in die Erde gesetzten Platten fortlaufend die ersten 10 Tage täglich, dann bis zu 3 Wochen jeden 2. Tag ein Paar zur Untersuchung zu entnehmen. Diese Versuchsreihen wurden nicht im Freien vorgenommen, sondern in Erde des gleichen Standortes, die in einen Kasten eingefüllt war (TOLLE 1957), der in einem halbdunklen Kellerraum bei $15-17^{\circ}\text{C}$ aufgestellt und bei annähernd gleicher Feuchtigkeit gehalten wurde. In einer der Versuchsreihen wurden an Stelle von Deckgläsern 1 mm starke gewässerte Astralonfolien verwendet (Kunststoff auf Cellulosebasis), um spezifische Einflüsse des Glases auszuschalten. Es wurden damit im wesentlichen die gleichen Ergebnisse erhalten wie mit den Glasdeckgläsern.

Ergebnisse

Alle Aufwuchsplatten wurden außer auf das Vorhandensein und die Ausbildung von *Streptomyces*-Mycelien vergleichsweise noch auf die Anordnung und Häufigkeit von Bakterien sowie auf den Entwicklungszustand von Pilzmycel hin angesehen. Die an den vier Versuchsreihen mit täglich entnommenen Aufwuchsplatten gewonnenen Beobachtungen wiesen gut übereinstimmend auf gewisse im folgenden kurz beschriebene Entwicklungsstadien der Aufwuchsflora hin (im Rahmen dieser Arbeit können nur wenige Abbildungen gebracht werden).

Platten, welche 24 Std im Boden waren, zeigten eine stark entwickelte Bakterienflora, vor allem an den Berührungsrändern von Erdklümpchen-Glas-Außenluft bzw. kleinen Bodenlufträumen. Häufigste Formen waren hier Stäbchenbakterien in unregelmäßiger Verteilung und gelegentlich kleine und große Bakterienfelder. Entlang dieser gut erkennbaren Ränder waren stets auch charakteristisch gewundene unverzweigte Fäden und Schlingen eines fädig wachsenden Bakteriums (*B. mycoides*-ähnlich, DEMETER u. MOSSEL 1933, Taf. II, Abb. 11 a) zu finden, das dadurch gut von *Streptomyces*-Mycel unterschieden werden konnte. Glasflächen, die in direkter Berührung mit Erdkrümeln waren, zeigten auch schon die typischen runden



Abb. 1. Junge *Streptomyces*-Hyph e nach 48 Std. Vergr. 1250mal

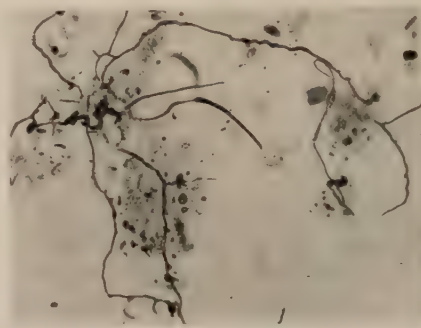


Abb. 2. *Streptomyces*-Mycel nach 3 Tagen. Vergr. 1250mal

Kolonien großer runder Bakterien, die von den meisten Untersuchern als *Azotobacter*-Kolonien angesprochen wurden. Ganz vereinzelt wurde ein kurzes Stück Pilzhyphe angetroffen.

Kleine, rein vegetative *Streptomyces*-Mycelien, meist aus einer wenig verzweigten Hyph e bestehend (Abb. 1), erschienen zuerst auf 48 Std im Boden verbliebenen Platten. Sie befanden sich teils auf den direkt mit Erde in Berührung gewesenen Stellen, teils mehr in der Nähe der zuvor erwähnten Ränder, einzelne Hyphen auf die freie Glasfläche ausstrahlend (wie auf Abb. 7). Vereinzelt wurde ein kleines Zentrum organischen Materials gefunden, von dem aus die Hyphen wegwuchsen. Sehr selten wurden auf den 1—2 Tage alten Platten Fragmente der typischen geraden, gebogenen oder spiraligen *Streptomyces*-Luftsporenketten angetroffen. Der Bakterienbewuchs war ähnlich wie nach 24 Std, Pilzhypen jedoch häufiger und intensiv anfärbt.

3, 4 und 5 Tage alte Bodenplatten wiesen kleine und große, d. h. mit vielen längeren und mehr oder weniger geraden Hyphen versehene vegetative *Streptomyces*-Mycelien auf (Abb. 2), die nun schon vereinzelt Ausläufer von Sporenketten oder — an ganz kleinen Mycelien des Erdkrumenrandes — versportete Lufthyphen aufwiesen. Die Nährstoffarmut an diesen Stellen, meist auf dem freien Glas, bedingt offenbar eine schnelle Ausbildung winziger versporteter Lufthyphen (5—10 Sporen) an

den kleinen vegetativen Hyphen. Auch auf diesen Platten kamen vereinzelt kleine Fragmente von isoliert liegenden Sporenketten und Sporenspiralen vor. Größere Anhäufungen vegetativen Mycel mit vielseitig ausstrahlenden Hyphen (wie in Abb.3) wurden fast ausschließlich in und an mehr oder weniger intensiv angefärbten, unregelmäßig geformten organischen Partikelchen aufgefunden, welche vielfach Reste abgestorbener nackter Bodenamoeben sein konnten. Neben jungen, intensiv angefärbten Pilzhypen ohne irgendwelche umgebende Bakterien, fanden sich zunehmend solche, bei denen der Zellinhalt nur hellrosa angefärbt war, dafür aber die Hyphen von vielen kleinen kokkenförmigen Bakterien oder Kurzstäbchen umsäumt waren — streckenweise mehr vereinzelt, gelegentlich in größeren Ansammlungen. Diese Stadien beschrieb CHOLODNY erstmals eingehend und sah in ihnen bakterielle Zersetzungsstadien absterbender älterer Pilzhypenteile.

Auf 6, 7 und 8 Tage alten Bodenplatten zeigte sich bei der Mehrzahl der *Streptomyces*-Mycelien eine Zunahme des Anteils an fragmentierten langen Hyphen (Chlamydosporen nach WILKIN u. RHODES 1955) und ein häufigeres Auftreten einzelner typischer gerader und spiraler Luftmycel-Sporenketten. Kleine, über-

wiegend aus vegetativen Hyphen bestehende Mycelien fanden sich vor allem in der Randzone Erde—Luft—Deckglas, größere Mycelien mit davon ausgehenden in Sporen fragmentierten Hyphen meist nur in der Nähe stark angefärbter organischer Substanzklümpchen (Abb.3 und 4).

9, 10 und 12 Tage. Die Häufigkeit von langen, fragmentierten Hyphen und von Sporenketten gegenüber vegetativen Hyphen war erhöht. Vereinzelt zweigten sie ab von sehr schwach und unregelmäßig angefärbten, in der Umgebung von organischer Substanz befindlichen vegetativen Hyphen, die sich offenbar wie meist die Pilzhypen in autolytischem Zerfall befanden, nur daß sie im Gegensatz zu diesen nicht von Bakterien umgeben waren (Abb.5).

14—24 Tage. Vegetative *Streptomyces*-Hyphen wurden nur ganz vereinzelt angetroffen. Überwiegend kamen in Sporen fragmentierte lange Hyphen und verschiedene Typen von Luftmycel-Sporenketten in größeren Mengen an den einzelnen Stellen vor (Abb.6) [Sektionen: *Rectus flexibilis* (Abb.5 und 6) und *Spira* (Abb.4) des neuen Systems von

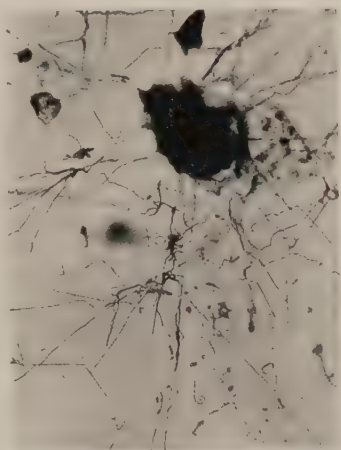


Abb. 3. Nährstoffzentrum mit allseitig abgehenden veget. Hyphen mit Chlamydo- und Luftmycelsporen nach 7 Tagen.
Vergr. 300mal

PRIDHAM u. Mitarb. 1958]. Bis auf einzelne größere Bakterienfelder und Kokkenkolonien waren Bakterien viel seltener auf diesen älteren Platten als auf den wenige Tage alten. Die Häufigkeit von Pilzhypen war ebenfalls geringer. An vielen Stellen wurden Parallelstreifen von Bakterien angetroffen, die den ehemaligen Verlauf inzwischen aufgelöster Pilzhypen markierten.

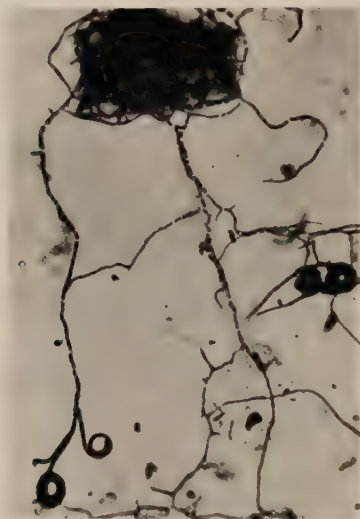


Abb. 4. Teil eines in Sporen fragmentierten *Streptomyces*-Mycel an zersetzter Substanz und ansitzende Sporenspiralen nach 8 Tagen.
Vergr. 1250 mal

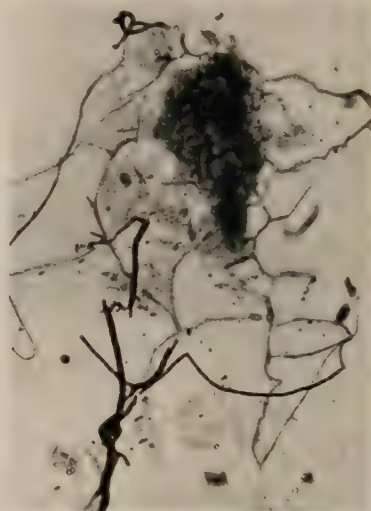


Abb. 5. Teil eines autolytisch zerfallenden *Streptomyces*-Mycel an zersetzter Substanz mit Sporenketten nach 9 Tagen.
Vergr. 1250 mal

Auf den älteren Bodenplatten fanden sich in dem dünnen anhaftenden Erdbelag mehr und mehr typische S-förmig geschlängelte Kriechspuren kleiner Bodennematoden.

Nimmt man das jeweils zu einem Zeitpunkt am häufigsten aufgetretene Entwicklungsstadium ähnlich großer Streptomyceten-Mycelien als ein Charakteristicum, so erhält man im ganzen das Bild einer fortschreitenden Entwicklung dieser Aufwuchsflora mit einem Beginn sichtbaren, rein vegetativen Wachstums nach 48 Std (Abb. 1) und einem Endstadium, in welchem die Streptomyceten in ihren Sporenformen in vorübergehendem Ruhezustand überwiegen (Abb. 4, 5 und 6). Dies Ergebnis führte zu dem Versuch, eine ebensolche Entwicklungsreihe experimentell noch deutlicher dadurch herbeizuführen, daß die angewandten Aufwuchsplatten vor dem Einbringen in den Boden gleichmäßig mit *Streptomyces*-Sporen beimpft wurden.

Dies geschah durch Abklatschen der Platten auf dem versporteten Luftmycelrasen eines in Petrischalen auf Agar kultivierten Boden-*Streptomyces*-Stammes. Abimpfen

des gleichen Sporenmaterials auf Peptonagar-Deckglaskulturen, bewies eine ausgezeichnete Keimfähigkeit des verwendeten Sporenmaterials unter diesen Bedingungen.

Das Einbringen der mit Luftmycelsporen beimpften Aufwuchsplatten in frische Erde des gleichen Bodens wie im vorigen Versuche (in den beschriebenen Kasten) geschah auf zwei verschiedene Arten:

1. Beimpfte Deckgläschen wurden (senkrecht) direkt an die Erde angedrückt und bis zur Entnahme in gleicher Stellung belassen.

2. Beimpfte Objektträger wurden senkrecht an die Erde angedrückt und dann von unten nach oben an der Erde abgestrichen. Auf die dabei entstandene Fläche legte man einen neuen sauberen Objektträger auf und ließ ihn etwa 1 cm aus dem Boden herausragen.

Wesentlicher Unterschied ist dabei, daß alle Glasstellen, welche beim Anlegen nicht direkt mit Erde in Berührung kommen, sondern gegen kleine Lufträume des Bodens grenzen, bei 1. vollbedeckt sind mit Sporen, bei 2. jedoch freie Glasfläche sind. In beiden Fällen sind die Berührungsflächen Erde-Glas mit *Streptomyces*-Sporen gleichmäßig bedeckt.

Die systematische Durchmusterung der alle 24 Std bis zu 15 Tagen entnommenen Deckgläschen und Objektträger führte zu folgendem nicht erwarteten Ergebnis:

Die in den Boden eingebrachten, nach Art und Größe sehr gut auffindbaren *Streptomyces*-Sporen wurden, abgesehen von folgenden Fällen, ungekeimt im Boden wiedergefunden und keinerlei Aufwuchs vegetativen Mycel erreicht:

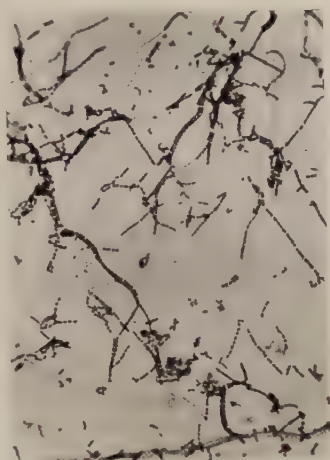


Abb. 6. Anhäufung von *Streptomyces*-Sporenketten nach 14 Tagen.
Vergr. 600mal

1. Zuerst nach 48—72 Std fanden sich auf den Objektträger-Aufwuchsplatten ausschließlich am obersten Erdbodenrand aus den eingebrachten Sporen ausgewachsene kleine vegetative Hyphen (Abb. 7). Wachstumsrichtung der Hyphen war stets die freie Glasfläche, nicht der Erdboden. Auf späteren Platten fanden sich winzige Mycelien mit ganz kurzen Luftmycel-Sporenketten (Abb. 8). Ganz vereinzelt wurden auch kleine Hyphen, welche sich nicht weiterentwickelten, an Erdklümpchenrändern im Inneren der Platten angetroffen.

2. Auf den 10—15 Tage im Boden verbliebenen Deckgläschen fanden sich verschiedentlich *Streptomyces*-Mycelien in kleinen Klümpchen organischer Substanz mit nach vielen Seiten auswachsenden Hyphen und davon abzweigenden kurzen versporteten Lufthyphen (Abb. 9). Die stark angefärbten Klümpchen waren abgestorbene nackte Bodenamoeben, die nun von den Streptomyceten zersetzt wurden. Es zeigte sich nämlich auf diesen Aufwuchsplatten, die ja auch auf den an Bodenlufträume

angrenzenden Glasflächen mit *Streptomyces*-Sporen bedeckt waren, daß gerade an diesen Stellen von Tag zu Tag eine stark zunehmende Anzahl von nackten und in geringerem Maße auch von beschalteten Amöben (*Diffugia*) aufgefunden wurde. Diese weideten offensichtlich den gesamten Sporenrasen ab, so daß die 12—15 Tage alten Platten zwar noch große Mengen von Amöben und vereinzelte Häufchen halbverdauter Sporen (Abb. 10 und 11), aber nur noch kleine Reste des ursprünglichen Sporenüberzuges erkennen ließen. In den Sporenfeldern der jüngeren Platten zeichneten sich die S-förmigen Kriechspuren kleiner Bodennematoden schön ab.

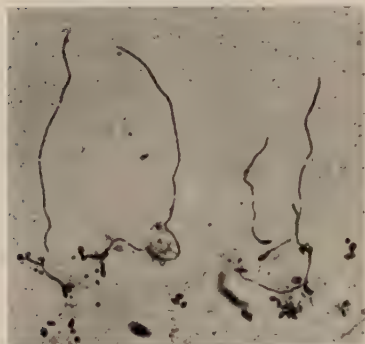


Abb. 7. In den Boden eingebrachte *Streptomyces*-Sporen und nach 3 Tagen zur freien Glasfläche ausgewachsene Hyphen.
Vergr. 1250 mal

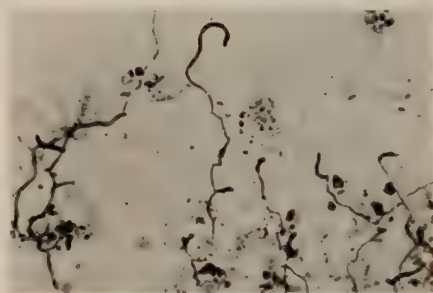


Abb. 8. *Streptomyces*-Kümmernmycelien mit versporteten Lufthyphen aus eingepfiffen Sporen an Erdrändern nach 4 Tagen. Vergr. 1250 mal

An allen Stellen, wo Erde und Glas sich direkt berührten und wo sich bodeneigene Streptomyceten auf den anderen Platten durchaus entwickelt hatten, lagen die eingebrachten Sporen unverändert.

Diskussion

Auf Grund der gewonnenen direkten Beobachtungen läßt sich folgendes Bild des Wachstumsverhaltens der bodenbewohnenden Streptomyceten in ihrem eigenen natürlichen Lebensraum im Kontakt mit Aufwuchsplatten entwerfen. Das Wachstum vegetativer Hyphen beginnt nach Berührung der Keime mit abbaufähiger gelöster oder noch geformter organischer Substanz. Je nach der Menge der Nährstoffe entwickelt sich ein mehr oder weniger großes vegetatives Mycel — Substratmycel —, von welchem aus vegetative Hyphen vielseitig in den umgebenden Bodenraum auswachsen. Je kleiner die Nährstoffmenge ist, um so eher bilden sich am Substratmycel kleine versportete Lufthyphen (auf dem reinen Glas schon innerhalb von 24 Std). Die unmittelbar im organischen Substrat gewachsenen Hyphen unterliegen mit dessen Verbrauch einer autolytischen Auflösung; die vom Substrat ausgewachsenen langen,

zunächst vegetativen Hyphen lösen sich entweder auch selbst auf — vor allem wo sie direkt im Boden gewachsen sind — (kein bakterieller Abbau zu beobachten), so daß nur die von ihm abzweigenden versporteten Luft-hyphen zusammenhanglos liegen bleiben. Oder aber sie fragmentieren auf ihrer ganzen Länge in mehr oder weniger zylindrische Chlamydo-sporen, die ähnlich resistent wie die aus Luftmycel entstandenen Sporen bis zu einem neuen Nährstoffangebot ruhig im Boden überdauern. So führt jede kleinste Nährstoffmenge, die eine nur geringe Entwicklung ruhender Sporen bewirkt, zu einer starken Vergrößerung der Anzahl ruhender tätigkeitsbereiter Vermehrungseinheiten. Große Nährstoffzentren ermöglichen dem Organismus eine vielseitige in den Boden ausstrahlende, ununterbrochene weitere Verbreitung. Gegenüber den beobachteten Bodenpilzen, deren ältere vegetative Hyphenteile regelmäßig einem bakteriellen Abbau unterliegen, ist dies Verhalten der Streptomyceten auffällig unterschieden. Mit anderer Methodik fand auch SCINNER (1951), daß der größere Teil der Streptomyceten im Boden in Sporenform vorliegt.

Das Unvermögen zur vegetativen Entwicklung der künstlich in den Boden eingebrachten Sporen eines bodenbewohnenden *Streptomyces*-Stammes stellt einen Parallelfall dar zu den an Bodenpilzen gemachten Beobachtungen von CHINN (1953), DOBBS u. HINSEN (1953), WINTER (1955), JACKSON (1958) und von PARK (1955, 1957). Nach seiner Begriffsbestimmung ist der Stamm für den verwendeten Boden exochthon und kam deshalb offenbar nur an den Stellen zu einer vegetativen Entwicklung, wo der Einfluß der bodeneigenen (zymogenen und autochthonen) Mikroflora nicht vorhanden war, wie z. B. am Erdrand auf dem freien Glas und auf den durch ihn im Überfluß vorhandenen und infizierten (abgestorbenen) Bodenamoeben. Die in diesem Boden von Natur aus vorhandene Mikroorganismen-Lebensgemeinschaft könnte eine vegetative Entwicklung des exochthonen Stammes sowohl aus Gründen des Nährstoffmangels wie durch antagonistische Beeinflussung verhindert haben.

Durch die Technik der täglichen Entnahme von Bodenplatten konnte schließlich noch ein deutlicheres Bild von der Eigenart der Aufwuchsplattenmethode erhalten werden. Dies läßt sich am besten folgendermaßen charakterisieren:



Abb. 9. *Streptomyces*-Mycel in zersetzter Bodenamoebe und davon ausgehende Hyphen mit Sporenketten nach 15 Tagen. Vergr. 1250 mal

Das Anstechen des Bodens für das Einlegen der Aufwuchsplatte bringt durch die geänderten Verhältnisse und die Verschiebung der heterogenen Bodenkrümel an der Schnittfläche die für alles Spätere entscheidende Änderung und Störung der bis dahin dynamisch eingespielten Lebensverhältnisse aller Mikroorganismen mit sich. Die jeweils andersartigen Verhältnisse rufen entsprechende Reaktionen bei der Mikroflora hervor, indem neue Nährstoffpartikel verfügbar werden bzw.

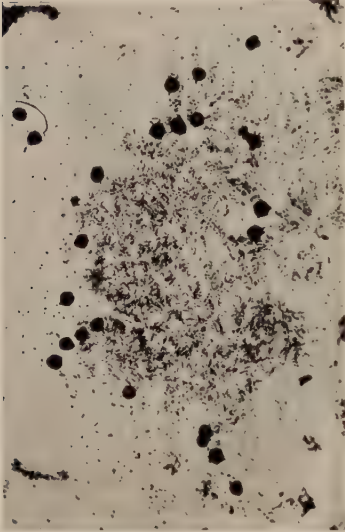


Abb. 10. Zahlreiche Bodenamoeben beim Abweichen von Resten eines auf die Platten gebrachten *Streptomyces*-Sporenbelags nach 15 Tagen. Vergr. 150mal



Abb. 11. Bodenamoeben vertilgen *Streptomyces*-Sporen, verdaute Reste hinter sich lassend. Bodenplatte nach 15 Tagen. Vergr. 1250mal

nährstoffhaltiges Bodenwasser mit anderen Keimen in Berührung kommt. Die freie Glasfläche bietet für den Aufwuchs neuen Raum, der nun in den sich wandelnden Lebensraum mit einbezogen wird. So wird die sich entwickelnde Aufwuchsflora ein Ausdruck für die Herstellung eines neuen Gleichgewichtes von Mikroorganismen und möglichen Nährstoffen an den betreffenden Aufwuchsflächen (THIENEMANN 1939). Darum findet man mit fortschreitender Zeit eine durchaus gerichtete Entwicklung der Mikroflora auf den Platten, welche bis auf Stellen lokaler Veränderung (Umwälzung durch Bodentiere, Pflanzenwurzeln und Wasserbewegung) einem gewissen Reifezustand zustrebt, wie er auf allen lange im Boden verbliebenen Aufwuchsplatten gegenüber solchen, die 1—10 Tage darin lagen, beobachtet werden kann. Der anfangs sehr starke Bakterienbewuchs geht zurück bis auf dauerhaftere Formen, später ebenso der Bewuchs mit Pilzhypphen. Die Streptomyceten entwickeln sich und liegen

schließlich überwiegend in der Sporenform vor. So kommt es, daß für das Bild dessen, was auf älteren Aufwuchsplatten zu sehen ist, im ganzen all dasjenige von entscheidender Bedeutung ist, was bald nach dem Anlegen der Platte an den Boden auf sie gelangen konnte. Dies bestätigt auch die im Mittel etwa gleich bleibende und nicht steigende Zahl von *Streptomyces*-Mycelien von 3 Tage alten bis zu 10 Tage alten Platten; später fällt dann die Zahl sogar ab.

Es darf also gesagt werden, daß wir mit Anwendung der zunächst nährstofffreien Aufwuchsplatten nicht einfach Beobachter eines kontinuierlich weitergehenden Bodenlebens werden, sondern wir vollziehen einen Einbruch, auf den die angrenzende Mikroflora in einer Entwicklungsfolge mit der Einbeziehung des Fremdkörpers in ihren Lebensraum reagiert. Je nach dem gewählten Zeitpunkt beobachten wir das durch die Veränderung ermöglichte Aufwachsen, Reifen und Ableben der verschiedenen nährstofffindenden Mikroorganismengruppen in ihren Eigenarten und ihren wechselseitigen Beziehungen.

Zusammenfassung

Der Entwicklungszustand von bodeneigenen *Streptomyces*-Mycelien wurde auf Aufwuchsplatten untersucht, welche anfangs täglich, später jeden 2. Tag aus dem Boden entnommen waren. Im ganzen ergab sich das Bild einer Entwicklung, nach welcher schließlich der größte Teil der Streptomyceten in Form von Chlamydosporen und Luftmycelsporen angetroffen wurde. In den gleichen Boden eingebrachte *Streptomyces*-Sporen blieben zum größten Teil ungekeimt liegen und konnten sich nur am Erdrand auf dem freien Glas und in abgestorbenen Bodenamoeben entwickeln.

Literatur

- CHINN, S. H. F.: Canad. J. Bot. **31**, 718 (1953). — CHOLODNY, N.: Arch. Mikrobiol. **1**, 620 (1930). — CONN, H. J.: J. Bact. **17**, 399 (1929); Abstr. Bact. **1**, 40 (1917); Zbl. Bakt., II. Abt. **87**, 233 (1932).
- DEMETER, K. J., u. H. MOSSEL: Zbl. Bakt., II. Abt. **88**, 384 (1933). — DOBBS, C. G., and W. H. HINSEN: Nature (Lond.) **172**, 197 (1953). — DRECHSLER, C.: Bot. Gaz. **67**, 65 u. 147 (1919).
- ERIKSON, D.: J. Gen. Microbiol. **1**, 39 (1947); **1**, 45 (1947); **2**, 252 (1948); Annual Rev. Microbiol. **3**, 23 (1949).
- GARRET, S. D.: Biology of root-infecting fungi. Cambridge Univ. Press. 1956. — GIBSON, J.: Microbial ecology. 7. Symp. Soc. Gen. Microbiol. S. 22—41; Univ. Press Cambridge 1957.
- HENRICI, A. T.: Molds, yeasts and actinomycetes. N. Y., J. Wiley u. Sons, Inc. (2nd Edit., 1948). — HENSSEN, A.: Arch. Mikrobiol. **26**, 373 (1957). — HOPF, M.: Arch. Mikrobiol. **14**, 661 (1950). — HULPOL, N.: Arch. Mikrobiol. **7**, 579 (1936).
- JACKSON, R. M.: J. Gen. Microbiol. **18**, 248 (1958). — JAGNOW, G.: Arch. Mikrobiol. **25**, 274 (1956). — JANNASCH, H. W.: Arch. Mikrobiol. **23**, 146 (1955). — JENSEN, H. L.: Proc. Linnean Soc. N. S. Wales **58**, 181, (1933); **59**, 101, 200 (1934); **68**, 67 (1943).

- KRAINSKY, A.: Zbl. Bakt. II, **41**, 649 (1914). — KRASSILNIKOV, N. A.: The guide to the ray fungi, Actinomycetales. Jzv. Akad. Nauk. USSR., Moskau (1941).
LIESKE, R.: Morphologie und Biologie der Strahlenpilze. Leipzig 1921.
MEYER, R.: Arch. Mikrobiol. **6**, 461 (1935); Mikrokosmos **39**, 126 (1950).
ORSKOV, J.: Investigations into the morphology of the ray fungi. Copenhagen 1923.
PARK, D.: Trans. Brit. Mycol. Soc. **38**, 130 (1955); **40**, 283, 358 (1957). — PFENNIG, N.: Diss. math.-nat. Fakultät Göttingen (1952); Arch. Mikrobiol. **29**, 90 (1958). — V. PLOTHO, O.: Arch. Mikrobiol. **11**, 33 (1940); **14**, 142 (1950). — PRIDHAM, T. G., C. W. HESSELTINE u. R. G. BENEDICT: Appl. Microbiol. **6**, 52 (1958).
RIPPEL, A.: Fortschr. Bot. 1933 bis 1937; Grundriß der Mikrobiologie, 3. Aufl., Berlin: Springer 1955. — RIPPEL, A., u. P. WITTER: Arch. Mikrobiol. **5**, 24 (1934). — ROSSI, G., S. RICCARDO: Nuov. Ann. dell. Agr. **7**, 457 (1927).
SCINNER, F. A.: J. Gen. Microbiol. **5**, 159 (1951).
TEMPEL, E.: Arch. Mikrobiol. **2**, 40 (1931). — THIENEMANN, A.: Grundzüge einer allgemeinen Ökologie. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. 1939. — TOLLE, R.: Diss. math.-nat. Fakultät Göttingen. (1957). — TRIBE, H. T.: Microbial Ecology. 7. Symp. Soc. Gen. Microbiol. S. 287—291, Univ. Press Cambridge 1957.
WAKSMAN, S. A.: Soil. Sci. **8**, 71 (1919).; The Actinomycetes. Waltham, Mass: Chronica Botanica Company, 1950. — WAKSMAN, S. A., u. R. E. CURTIS: Soil Sci. **1**, 99 (1916); **6**, 309 (1918). — WILKIN, G. D., u. A. RHODES: J. Gen. Microbiol. **12**, 259 (1955). — WINOGRADSKY, S.: Ann. Inst. Pasteur **39**, 299 (1925); Microbiologie du sol. Paris: Masson et Cie. 1949. — WINTER, A. G.: Z. Pfl. Ernähr. Düng. und Bodenk. **69**, 224 (1955).
ZOBELL, C. E., u. E. C. ALLEN: J. Bact. **29**, 239 (1935).

(Aus dem Organisch-Chemischen Institut, Biochem. Abt., der Univ. Göttingen)

Der Actinomycin-Einfluß auf den Stoffwechsel von *Candida albicans**

Von
PAUL PRÄVE

Mit 14 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. April 1958)

Das aus *Streptomyces chrysomallus* gewonnene Antibioticum Actinomycin zeigt im Verdünnungstest gegen Bakterien eine sehr hohe Wirksamkeit (*Staphylococcus aureus* 0,1 γ /ml; *Escherichia coli* 100 γ /ml wirk-same Mindesthemmkonzentration).

Bei therapeutischen Untersuchungen ergaben sich besonders bei Einwirkung auf tierische bösartige Geschwülste und das lymphatische System gute Erfolge (BROCKMANN, BOHNE, FRIEDRICH u. HACKMANN 1954). Danach sind eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht worden, die sich mit der Wirksamkeit des Actinomycins besonders gegen einige Krebsformen befassen.

Da der Test gegen Bakterien nichts über den Angriffspunkt aussagt und mit Hefen keine vergleichbare Wirksamkeit zu erhalten ist, erhebt sich die Frage, wie das Actinomycin in den Stoffwechsel eingreift. — Der Einfluß von verschiedenen Antibiotica auf Hefe wurde von STRUTZ u. KUNTZE (1955) untersucht. WAKSMAN (1945) stellte gegen Pilze der *Trichophyton*-Gruppe eine Hemmwirkung von Actinomycin fest. Eigene Beobachtungen haben einen Einfluß gegen Hefestämme ergeben. Mit der Hefe hat man einen Modellorganismus zur Hand, der in seinen Stoffwechselreaktionen eine Ähnlichkeit mit der Krebszelle zeigt.

Methodik

Als Hefestamm wurde *Candida albicans* verwendet, der im Biochemischen Institut als Teststamm gehalten wird.

Kulturmethoden. In 200 ml Erlenmeyerkolben wurden 200 ml gepufferte Sabouraud-Nährlösung¹ gegeben; bei Atmungs- und Gärungsmessungen unter Fortlassen des Peptons. Die Kolben wurden mit Gummistopfen, die mit Cellophan umwickelt waren, verschlossen. — Der *Candida albicans*-Stamm wurde in 10 ml Sabouraud-Bouillon geimpft, bei 37° C 24 Std bebrütet, 1 Tropfen in neue 10 ml Bouillon geimpft und wiederum 24 Std bei 37° C bebrütet. Diese Anzucht wurde

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

¹ 4% Glucose, 1% Pepton, mit Phosphatpuffer nach SÖRENSEN auf pH 4,8 eingestellt.

quantitativ in die Versuchskolben gegeben und letztere bei 28° C 24, 48 und 96 Std gehalten. Die abzentrifugierten Hefen wurden mit Phosphatpuffer gewaschen (pH 4,8) und für die Versuche benutzt. — In die Kolben wurden in je 10 ml Äthanol gelöste Actinomycin I-Mengen und in einige 10 ml Äthanol für die Blindprobe gegeben. (Die Actinomycin I-Mengen entsprechen den angegebenen Konzentrationen: 100 γ , 75 γ , 25 γ , 5 γ , 1 γ je Milliliter Gesamtsupstrat.)

Gasstoffwechsellmessungen. Atmung, Leeratmung, Wachstum, aerobe und anaerobe Glykolyse wurden in einer Warburgapparatur gemessen. Die Gefäße erhielten jeweils 1 ml Hefesuspension (10 mg Trockensubstanz je Milliliter), 1 ml Nährsubstrat und 0,2 ml 20%ige KOH im Mittelgefäß. Bei der anaeroben Glykolyse wurde Stickstoff, sonst Luft als Gas verwendet. Temperatur 30° C. Bei Hemmstoffzugabe wurden 0,4 ml gegeben.

Papierchromatographie. Das Actinomycin I wurde mit Chloroform und danach mit Butanol aus der Nährlösung extrahiert, abgedampft, mit Aceton aufgenommen und getrennt als Rundchromatogramm mit dem System Butylacetat : Dibutyläther : 10%iger Kresotinatlösung = 3 : 1 : 4 bestimmt.

Die Trockensubstanzbestimmung wurde als Trübungsmessung bzw. durch Auswiegen der bei 105° C getrockneten Hefemasse durchgeführt.

Ergebnisse

Einleitend ausgeführte Wachstumsmessungen mit *Bacillus subtilis* in Glucose-Pepton-Nährlösung bei verschiedenen pH-Werten ergaben unter Actinomycin-Einfluß (0,2 γ , 1 γ , 10 γ und 25 γ /ml) eine eindeutige Hemmung des *Bacillus* bei neutraler und alkalischer Anfangsreaktion schon nach 24 Std (entsprechend dem Verdünnungstest) für alle Actinomycin-Konzentrationen. Bei pH 4,8 zeigte sich ein geringes Wachstum gegenüber der Blindprobe.

Candida albicans wird von dem Antibioticum nicht so eindeutig beeinflusst. Unter den vorliegenden Bedingungen (10 ml Nährlösung in Reagenzgläsern) tritt ein um 1—3 Tage verzögertes Wachstum bei steigenden Actinomycin-Konzentrationen auf. Der pH-Wert steigt auf 5,1—5,2 an. (Höheres pH beeinträchtigt die Zellvermehrung.)

Unterschiede durch Kultivierung bei 28° C und 37° C waren nicht zu erkennen.

Tabelle 1. Die Stoffwechselgrößen von *Candida albicans* unter Actinomycineinfluß.

Actinomycin konz. 100 γ , 25 γ , 5 γ und 0 γ je ml

Actinomycin γ /ml	100	25	5	0
$Q_{O_2}^{Luft}$	4,2	3,5	2,5	3,5
$Q_M^{O_2}$	7,5	6,5	7,5	11,5
$Q_M^{N_2}$	0,4	1,2	2,4	13,0

Einfluß des Actinomycins auf die Stoffwechselgrößen von Candida albicans

Die Bestimmung des direkten Einflusses von Actinomycin auf die Hefezelle in der Warburgapparatur gab weitere

Hinweise auf eine Beeinflussung des Stoffwechsels. — Die Leeratmung zeigte in diesen Versuchen keinen Unterschied bei Hefezellen mit oder ohne Actinomycingabe. Unter diesen Bedingungen (10 mg Trockensubstanz je Milliliter) ließ sich im Warburggefäß mit Actinomycingabe von 5—100 γ je Milliliter ein leichter Anstieg des Wachstums feststellen.

In Tab. 1 sind die gemessenen Stoffwechselgrößen (nach Warburg) zusammengestellt.

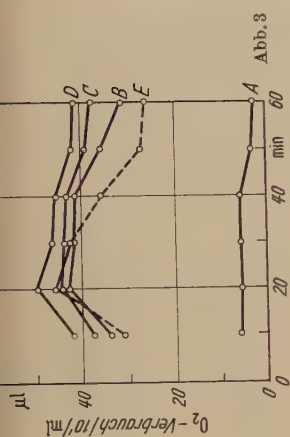


Abb. 3

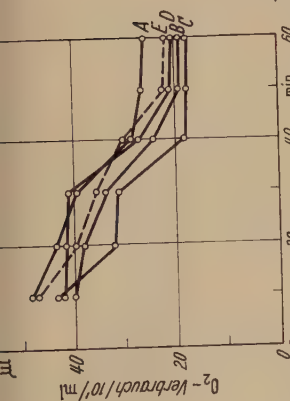


Abb. 2

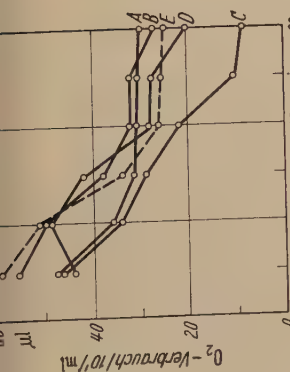


Abb. 1

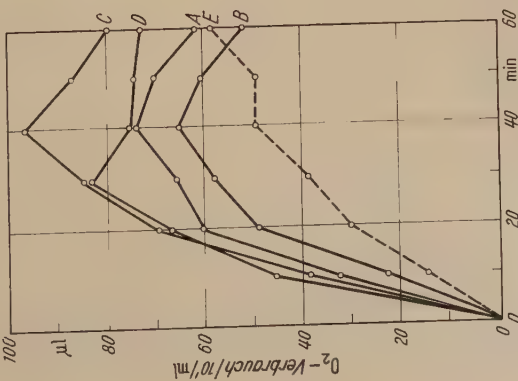


Abb. 4

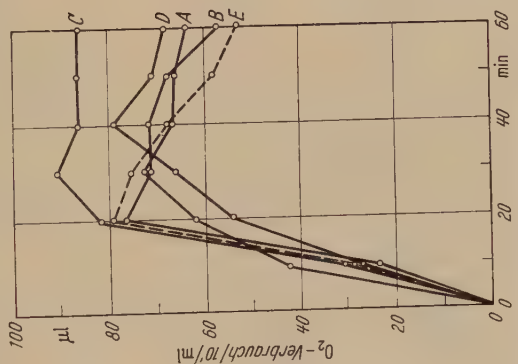


Abb. 5

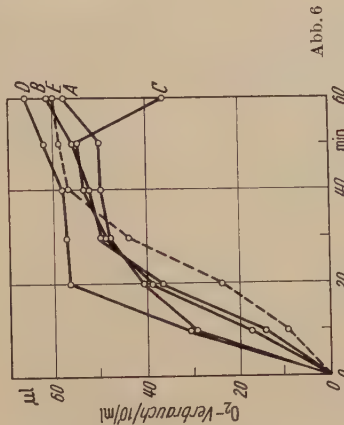


Abb. 6

Abb. 1—3. Leertätigkeit. Sauerstoffverbrauch von *Candida albicans* in Phosphatpuffer (pH 4,8); A 0 γ, B 25 γ, C 5 γ, D 1 γ und E 0 γ Actinomycin je Milliliter. Abb. 1 nach 24 Std., Abb. 2 nach 48 Std., Abb. 3 nach 96 Std.

Abb. 4—6. Atmung. Sauerstoffverbrauch von *Candida albicans* in Glucose (pH 4,8); Actinomycinkonzentration wie Abb. 1—3. Abb. 4 nach 24 Std., Abb. 5 nach 48 Std., Abb. 6 nach 96 Std.

Diese Werte lassen bei der anaeroben Glykolyse eine starke, bei der aeroben eine leichte Beeinflussung der Zellen erkennen. Die Atmungsänderung ist nicht eindeutig.

Aus den Versuchen kann geschlossen werden, daß unter Actinomycin-Einfluß die Glykolyse von *Candida albicans* gehemmt wird und daß eine Wachstumsverzögerung auftreten kann.

*Actinomycin-Einfluß auf
Candida albicans in verschie-
denen Einwirkungszeiten*

Um die Atmung bei Gegenwart von Glucose richtig beurteilen zu können, mußte die Leeratmung von *Candida albicans* gemessen werden. — Hierfür und für die

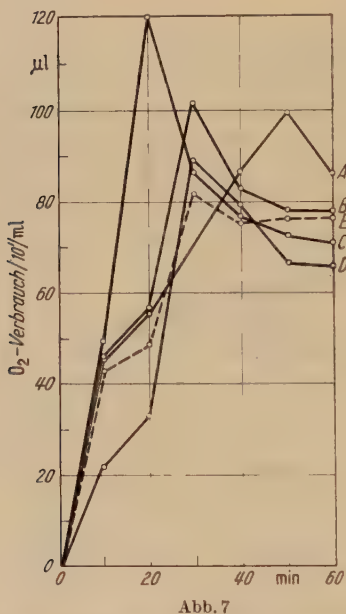


Abb. 7

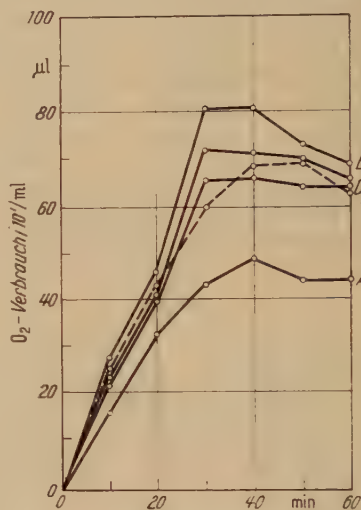


Abb. 8

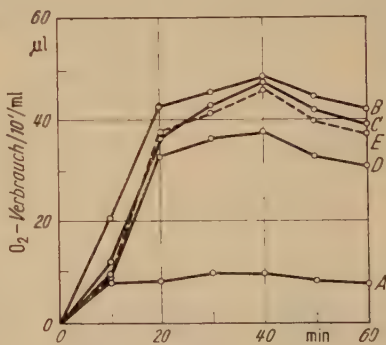


Abb. 9

Abb. 7—9. Wachstum. Sauerstoffverbrauch von *Candida albicans* in Glucose/Pepton (pH 4,8); Actinomycinkonzentration wie Abb. 1—3. Abb. 7 nach 24 Std., Abb. 8 nach 48 Std., Abb. 9 nach 96 Std.

folgenden Ergebnisse wuchsen die Hefen 24, 48 und 96 Std mit verschiedenen Actinomycinkonzentrationen, wurden abgenommen, gewaschen und im Warburggerät untersucht.

Die Abb. 1—3 zeigen das Verhalten der Hefe, wobei die stärkeren Konzentrationen ($A = 75 \gamma/\text{ml}$, $B = 25 \gamma/\text{ml}$) nach 24 und nach 48 Std

noch über der Blindprobe (*E*) liegen, nach 96 Std allerdings *A* völlig abgesunken ist und jetzt eine umgekehrte Reihenfolge auftritt, so daß mit fallender Konzentration eine deutliche Konstanz zu erhalten war, die noch über der Blindprobe liegt (Abb. 3).

Die Werte der Atmung (Abb. 4—6) müssen im Zusammenhang mit den Leeratmungskurven betrachtet werden, da letztere Ausgangswerte sind. So ergibt sich nach 24 Std (Abb. 4) eine starke Atmungssteigerung besonders bei den niedrigen Actinomycinkonzentrationen, die nach 48 Std (Abb. 5) zurückgegangen und nach 96 Std fast

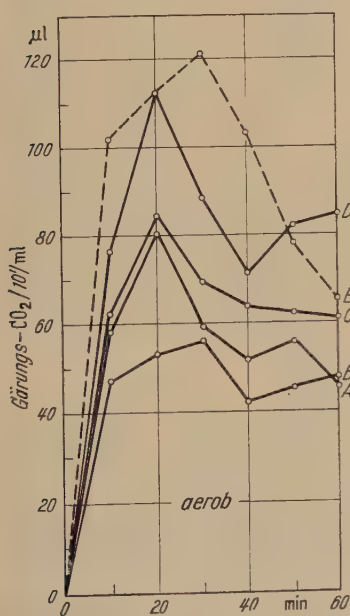


Abb. 10

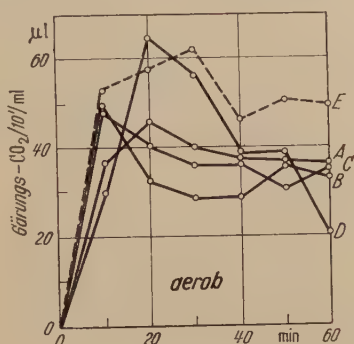


Abb. 11

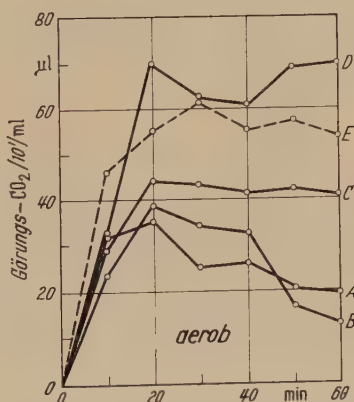


Abb. 12

Abb. 10—12. Aerobe Glykolyse. Gärungs- CO_2 von *Candida albicans* unter aeroben Bedingungen in Glucose (pH 4,8); Actinomycinkonzentration wie Abb. 1—3, Abb. 10 nach 24 Std, Abb. 11 nach 48 Std, Abb. 12 nach 96 Std

völlig gehemmt ist; lediglich bei *A* ist die Atmungsgröße normal erhalten geblieben.

Den Einfluß des Actinomycins auf das Vermögen der Hefe zur Vermehrung zeigen die Abb. 7—9. Nach 48 Std (Abb. 8) und mehr noch nach 96 Std Actinomycin-Einfluß (Abb. 9) ist eine deutliche Wachstumshemmung parallel zu den Trockensubstanzbestimmungen bei *A*

(75 γ /ml) zu erhalten. Die Hefen, die mit 25 γ und 5 γ Actinomycin je Milliliter wuchsen (*B* bzw. *C*), erfahren eine leichte Förderung und liegen immer über der Blindprobe (*E*).

Am offensichtlichsten sind die Wirkungen des Actinomycins auf die Glykolyse. Die Abb. 10—12 geben den Einfluß auf die aerobe Glykolyse von *Candida albicans* wieder; mit steigender Actinomycinkonzentration wird die Glykolyse gehemmt. Bei der niedrigsten Konzentration scheint kaum eine Beeinflussung wirksam zu werden, während die hohe eine kräftige Hemmung bewirkt.

Etwas andere Ergebnisse zeigt die anaerobe Glykolyse. Nach 24 Std ergaben sich gleiche, nur insgesamt gering höher liegende Werte wie

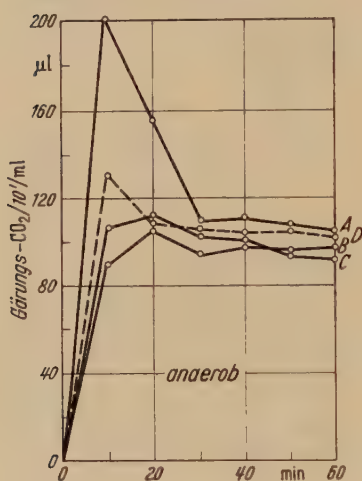


Abb. 13



Abb. 14

Abb. 13—14. Anaerobe Glykolyse. Gärungs- CO_2 unter anaeroben Bedingungen in Glucose (pH 4,8); A 100 γ , B 25 γ , C 5 γ , D 0 γ Actinomycin je Milliliter. Abb. 13 nach 48 Std, Abb. 14 nach 96 Std

nach 48 Std (Abb. 13). Kurve A (100 γ Actinomycin je Milliliter) läßt eine deutliche Förderung der anaeroben Glykolyse gegenüber dem Blindwert erkennen. Nach 96 Std (Abb. 14) bewirken alle Konzentrationen eine Hemmung (*B* hier 25 γ , *C* hier 5 γ /ml), besonders aber die hohe Actinomycin-Konzentration.

Die qualitative Bestimmung des in der Nährlösung verbliebenen Actinomycins ergab klare Actinomycin I-Zonen bei der 24 und 96 Std bewachsenen Nährlösung. Das Chromatogramm des 48 Std bewachsenen Nährsubstrates zeigte außer der Actinomycin I-Zone eine kräftig blau und eine grün fluoreszierende Zone bei 25 γ /ml, eine schwach blau fluoreszierende bei 100 γ /ml Gesamtsupstrat.

Mit der Dauer der Kultur nimmt die Zellgröße unter Actinomycin-Einfluß gering zu (durchschnittlich von 5 auf 6 μ). Dies trifft für alle Actinomycin-Konzentrationen

zu; lediglich die Zellen der 100 γ /ml-Konzentration bleiben nach 48 Std denen des 24 Std Ansatzes gegenüber gleich groß. Nach 96 Std sind allerdings auch sie im Durchschnitt 6 μ .

Die kleineren Stoffwechselgrößen nach längerer Kulturdauer sind auf eine altersbedingte Abnahme der Stoffwechselintensität der Zellen zurückzuführen.

Besprechung der Ergebnisse

Actinomycin I bewirkt bei der Hefe *Candida albicans* unter anaeroben Bedingungen bei hoher Actinomycin-Konzentration einen langsameren Glucoseverbrauch (Pasteur-Effekt). Nach 24 Std Actinomycin-Einfluß kann man bei *Candida albicans* eine Atmungssteigerung feststellen, die nur bei der hohen Konzentration über 96 Std anhält; parallel dazu geht die Leeratmung stark zurück. Die nach 96 Std auftretende Hemmung der anaeroben Glykolyse, besonders bei der hohen Konzentration, sowie die starke Hemmung der aeroben Glykolyse würden also der normalerweise hohen Glykolyse der Hefe entgegenwirken; gleichzeitig wird der auftretende Atmungsabfall korrigiert. Ein bleibender Einfluß auf die Zellvermehrung tritt erst nach 48 Std auf und läßt durch 75 γ Actinomycin je Milliliter nach 96 Std das Wachstumsvermögen stark hemmen. Danach müßten Glykolyse- und Vermehrungshemmung sowie Atmungserhaltung in die Stoffwechselbahnen eingreifen, die nach WARBURG (1955) bei der Krebszelle anders als bei einer normalen Zelle verlaufen. Hieraus erklärt sich die gute Wirkung von Actinomycin auf die Krebszelle, und folgerichtig bestätigt sich die Verwendung von *Candida albicans* als Modell- bzw. Testorganismus.

Zusammenfassung

1. Actinomycin I bewirkt einen Einfluß auf den Stoffwechsel der Hefe *Candida albicans*. Atmungserhaltung, Glykolysehemmung und Wachstumshemmung zeigen sich bei Zellen, die kurzfristig bzw. längere Zeit unter Actinomycin-Einfluß stehen.

2. Aus der Beobachtung, daß die antibiotische Wirkung auf die Krebs- und Hefezelle parallel läuft, ergibt sich die Brauchbarkeit der Hefezelle als Modell- und Test-Organismus.

Herrn Prof. Dr. H. BROCKMANN danke ich für die großzügige Unterstützung der Arbeit, Fräulein H. KRAUSE und Herrn S. UHL für technische Hilfe.

Literatur

BROCKMANN, H., A. BOHNE, H. FRIEDRICH u. CHR. HACKMANN: Dtsch. med. Wschr. 1954, 437. — STRUTZ, J., u. CL. KUNTZE: Naturwissenschaften 42, 464 (1955). — WAKSMAN, S. A.: J. Bact. 49, 585 (1945). — WARBURG, O.: Naturwissenschaften 42, 401 (1955).

(Aus der Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen
über Landau, Pfalz)

Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein

III. Die Energiequelle der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien*

Von

FERDINAND RADLER

(Eingegangen am 9. Mai 1958)

Der durch Bakterien im Wein hervorgerufene Abbau der l-Äpfelsäure zu Milchsäure und Kohlensäure erbringt im Gegensatz zu den meisten durch Mikroorganismen hervorgerufenen Gärungsvorgängen keinen Energiegewinn, den die Organismen für synthetische Prozesse, also zum Wachstum, ausnützen können. Im Gegenteil, die Verbrennungsenthalpie der Äpfelsäure (321 kcal/Mol) ist sogar geringer als die Verbrennungsenthalpie der daraus entstehenden Milchsäure (326 kcal/Mol), worauf zuerst von SCHANDERL (1943) hingewiesen worden ist. Die Decarboxylierung der Äpfelsäure ist daher nur möglich, wenn von den Bakterien gleichzeitig andere Energiequellen zum Wachstum ausgenützt werden können.

Bisher war die Energiequelle der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien nicht bekannt. Erst durch die Kultur dieser Bakterien in einem chemisch definierten Medium (RADLER 1958 b) wurde die Untersuchung der Beziehungen zwischen der Energiequelle der Bakterien und dem Äpfelsäureabbau möglich. Da es sich bei den Äpfelsäure-abbauenden Bakterien um Milchsäurebakterien handelt, wurde vermutet, daß sie zum Wachstum und damit zum Abbau der l-Äpfelsäure vergärbare Kohlenhydrate benötigen. Durch die im folgenden dargestellten Untersuchungen wird gezeigt, daß der Abbau der Äpfelsäure eine für die Bakterien unwesentliche Nebenreaktion ist, die nur durchgeführt wird, wenn den Bakterien zum Wachstum ausreichende Mengen an vergärbaren Kohlenhydraten zur Verfügung stehen.

Material und Methoden

Mikroorganismen: *Lactobacillus plantarum* und vier aus Wein isolierte Bakterienstämme, die zu den Gattungen *Lactobacillus* (Stamm 2 L) und *Leuconostoc* (Stamm 12a, 16a und 45b) gehören (RADLER 1958 a).

Herstellung und Zusammensetzung der Nährlösungen, Impfsuspension und Beimpfung, Papierchromatographie und Bestimmungsmethoden, soweit nicht

* Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL, zum 70. Geburtstag gewidmet.

besonders angegeben, siehe RADLER (1958 b). Zuckerbestimmung mit Anthron nach VILES u. SILVERMAN (1949). Manometrische Bestimmung der l-Äpfelsäure nach NOSSAL (1952), vgl. auch RENTSCHLER (1948). Bestimmung des Äthylalkohols oxydimetrisch mit KMnO_4 nach ROSMAN (in BAUER u. MOLL 1954) im Destillat nach Wasserdampfdestillation der schwach alkalischen Kulturlösung. Qualitativer Alkoholnachweis durch katalytische Umlagerung von violetterem Hydroxo-oxo-di(8-oxychinolino)-vanadin(V) zur roten Form des Komplexes (BIEBIG u. BAYER 1953). Bestimmung der flüchtigen Säure durch elektrometrische Titration des Wasserdampfdestillats.

Ergebnisse

Wie die meisten Milchsäurebakterien benötigen auch die aus Wein isolierten Äpfelsäure-abbauenden Bakterien ein vergärbares Kohlenhydrat oder eine entsprechende Verbindung als Energiequelle zum Wachstum. Tab. 1 zeigt, daß die Bakterien nur wachsen, wenn die Grundnähr-

Tabelle 1. Wachstum von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien in kohlenhydratfreier, halbsynthetischer Nährlösung bei Gegenwart und Abwesenheit von l-Äpfelsäure und Kohlenhydrat

Nährlösung		Bakterienstamm		
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	Stamm 2 L	Stamm 12 a
ohne Zusatz	Bakterienmasse (mg je ml) Milchsäurebildung ¹	0,02 —	0,01 —	0,01 —
+ 5 mg l-Äpfelsäure je ml	Bakterienmasse (mg je ml) Äpfelsäureabbau	0,01 —	0,01 —	0,01 —
+ 5 mg l-Äpfelsäure je ml + 0,5 mg Glucose je ml	Bakterienmasse (mg je ml) Äpfelsäureabbau	0,084 + ²	0,063 + ²	0,036 + ²
+ 0,5 mg Glucose je ml	Bakterienmasse (mg je ml) Milchsäurebildung ¹	0,078 (+)	0,072 (+)	0,025 (+)

¹ Papierchromatographischer Nachweis.

² Äpfelsäure vollständig abgebaut.

lösung Kohlenhydrat enthält. Die Gegenwart oder Abwesenheit von l-Äpfelsäure ist dabei bedeutungslos. Auch bei Gegenwart von Glucose wird selbst durch die 10fache Menge l-Äpfelsäure das Gesamtwachstum nicht nennenswert gefördert. Das Wachstum der säureabbauenden Bakterien und damit auch die Decarboxylierung der l-Äpfelsäure ist also abhängig von der Gegenwart einer Energiequelle. Im Traubenmost und auch im durchgegorenen Wein sind stets noch genügende Mengen an Kohlenhydrat vorhanden; es ist daher nicht erforderlich anzunehmen, daß die Bakterien des biologischen Säureabbaus Eiweißstoffe als Energiequelle verwerten.

Die beim Abbau der l-Äpfelsäure von den Bakterien benötigte Menge Kohlenhydrat ist sehr gering. Wie die Ergebnisse von Tab.1 gezeigt haben, genügen schon 0,5 mg Glucose, um 5 mg l-Äpfelsäure, also die 10fache Menge, völlig abzubauen. Die quantitative Bestimmung von Kohlenhydratbedarf und Äpfelsäureabbau bestätigt, daß beim Fehlen von Kohlenhydrat keine Äpfelsäure abgebaut wird und zeigt, daß für die Bakterien z. T. noch geringere Mengen von Kohlenhydrat genügen (etwa $\frac{1}{40}$ der l-Äpfelsäure bei Stamm 2L), um die Äpfelsäure völlig zu decarboxylieren, siehe Tab.2. Da das Wachstum der Bakterien von der Kohlen-

Tabelle 2. Die Abhängigkeit des Abbaus von l-Äpfelsäure durch säureabbauende Bakterien von der Gegenwart von vergärbarem Kohlenhydrat in halbsynthetischer Nährlösung mit einem Gehalt von 3,7 mg l-Äpfelsäure je Milliliter. Messungen nach 7 Tagen bei 23°

Kohlenhydrat (als Saccharosehydrolysat) mg/ml	<i>L. plantarum</i>			Stamm 2 L		Stamm 16 a	
	Äpfelsäure		Bakterien- menge	Äpfelsäure		Äpfelsäure	
	abgebaut mg/ml	%		abgebaut mg/ml	%	abgebaut mg/ml	%
7,5	3,7	100	1,0	3,7	100	3,7	100
2,2	3,7	100	0,65	3,7	100	1,6	43
0,76	3,7	100	0,27	3,7	100	n. b.	
0,38	3,0	81	0,12	3,7	100	1,6	43
0,15	1,6	43	0,05	3,7	100	1,0	27
0,075	1,2	32	< 0,05	3,3	89	0,0	0
0,0	0,0	0	0,0	0,2	5	0,0	0

hydratmenge bestimmt wird, können nur äußerst geringe Bakterienmengen zur Entwicklung kommen. Bei *L. plantarum* werden z. B. 1,6 mg l-Äpfelsäure von 0,05 mg Bakterienmasse vollständig abgebaut. Dieses Verhältnis ist keineswegs überraschend. Der ökonomische Koeffizient, d. h. die aus 100 Teilen Nährstoff gebildete Menge Trockensubstanz, beträgt für das Wachstum von Bakterien in der Regel weniger als 20 und für die anaeroben Milchsäurebakterien meist weniger als 10 (siehe KAUFMANN 1952). Überträgt man diese Verhältniszahlen auf den biologischen Säureabbau, so ist bei einem Verbrauch von 0,5 mg Glucose die Bildung von nicht mehr als 0,05 mg Bakterienmasse zu erwarten, die jedoch 5 mg l-Äpfelsäure zu decarboxylieren vermag, vgl. Tab.1.

Diese quantitativen Beziehungen gelten auch für den Abbau der Äpfelsäure unter den „natürlichen“ Bedingungen im Most oder Wein. Wenn steriltrierter Traubenmost mit einem Gehalt von etwa 5 mg l-Äpfelsäure je ml mit säureabbauenden Bakterien beimpft wird, so bilden die aus Wein isolierten Bakterien nach 20 Tagen bei 23° 0,04—0,11 mg Bakterienmasse je Milliliter, bei vollständigem Abbau der Äpfelsäure

[siehe RADLER (1958 b), Tab. 3]. Die Bakterienmengen, die den Abbau der Äpfelsäure im Most durchgeführt haben, entsprechen den an Modellversuchen gewonnenen Erwartungen; um 1 g l-Äpfelsäure im Most abzubauen, ist also die Entwicklung von etwa 0,01 g Bakterienmasse erforderlich, die zu ihrem Wachstum etwa 0,1 g Kohlenhydrat benötigen. Der Verbrauch einer so geringen Menge Kohlenhydrat dürfte sich der Bestimmung entziehen, da Traubenmost weit über 100 g Zucker und auch Wein noch mehrere Gramm Zucker je Liter enthält.

Tabelle 3. *Der Glucosestoffwechsel von aus Wein isolierten, Äpfelsäure-abbauenden Bakterien in halbsynthetischer Nährlösung*

		<i>L. plantarum</i>	Stamm 2 L	Stamm 12 a	Stamm 45 b
Glucoseverbrauch	mg/ml	12,2	12,3	12,3	5,0
	μ Mol/ml	67,7	68,2	68,2	27,8
Bakterienmasse	mg/ml	0,69	0,26	0,38	0,12
pH-Wert		3,28	3,25	3,65	4,25
Säurebildung					
ml n/100 KOH je ml	mg/ml	1,19	1,22	0,62	0,225
entspricht Milchsäure	mg/ml	10,7	11,0	5,6	2,0
	μ Mol/ml	119	122	62	22,5
Flüchtige Säure ml n/100 KOH je ml		0,03	0,026	0,05	0,05
Alkoholbildung	mg/ml	—	—	2,5	1,7
	μ Mol/ml	—	—	54	37

Da eine vollständige Oxydation zu CO_2 und H_2O von anaerob wachsenden Bakterien nicht durchgeführt werden kann, wurde untersucht, zu welchen Stoffwechselendprodukten die als Energiequelle benötigte Glucose von den Äpfelsäure-abbauenden Bakterien umgesetzt wird. Es wurde daher versucht, eine Bilanz des Glucosestoffwechsels von säureabbauenden Bakterien aufzustellen, ohne daß dabei aber auf die vielfältigen Probleme der bakteriellen Kohlenhydratdissimilation eingegangen werden sollte.

Zu diesem Zweck wurden die Bakterien in der halbsynthetischen Nährlösung gezüchtet, die aber weder Natriumacetat, noch Äpfelsäure und nur 0,15 g Xylose je l enthält, um die Säurebestimmungen nicht zu verfälschen. Die Kultur erfolgte in 90 ml Lösung in verschlossenen 100 ml Erlenmeyerkolben 20 Tage lang bei 23°. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 dargestellt.

Die papierchromatographische Untersuchung der Kulturflüssigkeiten ergab, daß von allen Kulturen als nichtflüchtige Säure nur Milchsäure in nennenswerten Mengen gebildet worden war, so daß die durch Titration

bestimmbare Säuremenge als Milchsäure berechnet werden konnte. Demnach wird von den homofermentativen Bakterien (*L. plantarum* und Stamm 2*L*) erwartungsgemäß eine reine Milchsäuregärung durchgeführt, indem aus 1 Mol Glucose annähernd 2 Mol Milchsäure entstehen. Demgegenüber wird von den heterofermentativen Stämmen 12*a* und 45*b* aus 1 Mol Glucose nur ungefähr 1 Mol Milchsäure gebildet. Die geringe Menge flüchtiger Säure, die sich überdies z. T. als Milchsäure erwies, wie die papierchromatographische Untersuchung des Destillates ergeben hatte, reicht nicht aus, um den Verbleib der 2. Hälfte Glucose zu erklären. Im Destillat der schwach alkalischen Kulturlösungen der Stämme 12*a* und 45*b* konnte Alkohol qualitativ nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der allerdings unspezifischen oxydimetrischen Alkoholbestimmung lassen mit einigem Vorbehalt — da die Kohlensäure nicht bestimmt wurde — den Schluß zu, daß die heterofermentativen Stämme 12*a* und 45*b* die Glucose nach dem für *Leuconostoc mesenteroides* bekannten Schema vergären (siehe RIPPEL-BALDES 1955, Seite 220), wonach Glucose je 1 Mol Milchsäure, Äthylalkohol und Kohlensäure ergibt.

Beim biologischen Säureabbau im Most oder Wein dürften entsprechende Stoffwechselvorgänge erfolgen. Eine Bestätigung für diese Vorstellung ergab folgender Versuch. Es wurde ein sterilfiltrierter Traubenmost mit dem Bakterienstamm 12*a* beimpft und 14 Tage bei 23° bebrütet. Nach dieser Zeit war die Äpfelsäure vollständig abgebaut, es waren 0,10 mg Bakterien je Milliliter gewachsen und im Wasserdampfdestillat konnten 0,3 mg Alkohol je Milliliter Traubenmost bestimmt werden. Wendet man die Ergebnisse des Modellversuchs (siehe Tab.3) in halbsynthetischer Nährlösung auf diesen Versuch an, dann ist auf Grund der Alkoholbildung anzunehmen, daß von den Bakterien etwa 1,2 mg Glucose je Milliliter verbraucht worden sind, woraus außer 0,3 mg Alkohol etwa 0,6 mg Milchsäure und 0,26 mg Kohlensäure entstanden sein müßten.

Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die Bakterien des biologischen Säureabbaus zum Wachstum und damit zum Abbau der l-Äpfelsäure neben den übrigen Nähr- und Wuchsstoffen vergärbare Kohlenhydrat benötigen. Die Bilanz des Glucosestoffwechsels ergibt, daß die Glucose weitaus zum größten Teil in die Endprodukte anaerober, bakterieller Kohlenhydratdissimilation umgewandelt wird: Milchsäure, Äthylalkohol und wahrscheinlich Kohlensäure. Bei Vergärung anderer Kohlenhydrate werden möglicherweise noch weitere Endprodukte, wie Mannit und Essigsäure, entstehen. Kohlenhydrat dient den säureabbauenden Bakterien als Energiequelle; der Äpfelsäureabbau erweist sich dagegen als Nebenreaktion unbekannter Bedeutung, die keinen merklichen Einfluß auf das Gesamtwachstum der Bakterien ausübt. Versuche, die hier nicht näher

dargestellt werden können, deuten darauf hin, daß durch die Gegenwart von Äpfelsäure das Anfangswachstum oder die Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien ein wenig gefördert wird. Im Verlauf des Wachstums der Bakterien wird aber anfangs im Verhältnis mehr Glucose und gegen Ende des Wachstums im Verhältnis mehr Äpfelsäure abgebaut. In wenig gepufferten Lösungen kann das Wachstum der Bakterien durch den Abbau der Äpfelsäure zu Milchsäure und CO_2 infolge der Erhöhung des pH-Wertes etwas begünstigt werden.

Die von den Bakterien zum Wachstum und zum Abbau der l-Äpfelsäure benötigten Kohlenhydratmengen sind sehr gering. 1 g l-Äpfelsäure wird von weniger als 0,01 g Bakterien abgebaut, die dabei heterofermentativ nur etwa 0,1 g Kohlenhydrat zu 0,05 g Milchsäure, 0,026 g Alkohol und 0,022 g CO_2 umsetzen. Bei dem hohen Gehalt des Weines an Alkohol (etwa 8 Vol.-%) und Milchsäure (2—6 g/l) ist es verständlich, daß sich im Wein die Endprodukte des Energiestoffwechsels der säureabbauenden Bakterien der Bestimmung entziehen. Es besteht daher kein Anlaß zur Annahme, daß die Bakterien beim biologischen Säureabbau im Wein andere Stoffe als Kohlenhydrate für den Energiestoffwechsel verwerten.

Infolge einer anderen Versuchsanstellung scheinen vorangegangene Untersuchungen (RADLER 1957) den hier dargestellten Ergebnissen zu widersprechen. Es war gezeigt worden, daß durch adaptierte Zellen von *Lactobacillus arabinosus* 17-5 der Äpfelsäureabbau in Traubenmost ohne nennenswerten Abbau von Kohlenhydraten erfolgt, und daß die Bakterien rasch absterben. Der Unterschied ist jedoch nur scheinbar, da in diesen Versuchen fast die 10fache Menge von ruhenden, also nicht wachsenden Zellen (1—3,5 mg/ml) zum Abbau der Äpfelsäure verwendet worden war als im Most wachsen können.

Zusammenfassung

Aus Wein isolierte Bakterien benötigen zum Wachstum und damit zum Abbau der l-Äpfelsäure zu Milchsäure und Kohlensäure als Energiequelle vergärbare Kohlenhydrate; die Gegenwart von Äpfelsäure ist dagegen für das Wachstum dieser Bakterien ohne wesentliche Bedeutung. Glucose wird entweder homofermentativ zu Milchsäure oder von anderen Bakterienstämmen heterofermentativ zu Milchsäure, Äthylalkohol und wahrscheinlich Kohlensäure umgesetzt. Der Abbau von 1 g l-Äpfelsäure wird bereits von weniger als 0,01 g Bakterien (Trockensubstanz) bewirkt, die zum Wachstum nur etwa 0,1 g Kohlenhydrat benötigen. Infolge der geringen Mengen sind die Endprodukte des Energiestoffwechsels der säureabbauenden Bakterien im Wein normalerweise nicht nachweisbar.

Herrn Prof. Dr. B. HUSFELD bin ich für die Förderung meiner Arbeiten zu Dank verpflichtet.

Literatur

- BIELIG, H. J., u. E. BAYER: Über Innerkomplexe des 5-, 4- und 3-wertigen Vanadiums mit 8-Oxycholin und deren Stereoisomerie. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **584**, 96—115 (1953). — FEIGL, F.: Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen. Leipzig 1953. — KAUFMANN, W.: Untersuchungen über den Energiehaushalt der Hefezelle und die Ökonomie einiger Energiestoffwechseltypen anderer Mikroorganismen. *Arch. Mikrobiol.* **17**, 319—352 (1952). — NOSSAL, P. M.: Estimation of l-malate and fumarate by malic decarboxylase of *Lactobacillus arabinosus*. *Biochem. J.* **50**, 349—355 (1952). — RADLER, F.: Untersuchungen über die experimentelle Durchführung des biologischen Säureabbaus. *Vitis (Landau)* **1**, 42—52 (1957). — *Naturwissenschaften* **44**, 232—233 (1957). — Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. Isolierung und Charakterisierung von Äpfelsäureabbauenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **30**, 64—72 (1958a); *Naturwissenschaften* **45**, 215 (1958). — Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. II. Der Nähr- und Wuchsstoffbedarf der Äpfelsäureabbauenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **31**, 1—15 (1958b). — RENTSCHLER, H.: Die biochemische Bestimmung der Äpfelsäure. *Mitt. Lebensmitt. Hyg.* **39**, 30—35 (1948). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. 3. Aufl. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955. — ROSMAN, B.: *Z. anal. Chem.* **91**, 214 (1933), zit nach BAUER, K. H., u. H. MOLL: Die organische Analyse. Leipzig 1954. — SCHANDERL, H.: Über den bakteriellen Säureabbau im Wein. *Dtsche. Weinzeitung*. 28. Mai 1943. — VILES, F. J., and L. SILVERMAN: Determination of starch and cellulose with anthrone. *Analyt. Chem.* **21**, 950—954 (1949).

Myxoxanthophyll als Hauptcarotinoid von *Mycobacterium phlei**

Von

H. G. SCHLEGEL

Mit 1 Abbildung im Text

(Eingegangen am 12. April 1958)

Bei der Charakterisierung der Pigmente eines dunkelrotfarbigen Stammes von *Mycobacterium phlei*, der zu Untersuchungen über die Biosynthese der Carotinoide herangezogen wurde, konnte das Hauptpigment als Myxoxanthophyll identifiziert werden. Dieses Pigment ist bisher nur in Blaualgen aufgefunden worden (HEILBRON u. LYTHGOE 1936, TISCHER 1938, KARRER u. RUTSCHMANN 1944) und ist offenbar ein für die Gruppe der *Cyanophyceae* typisches Pigment (GOODWIN 1957). Der Strukturaufklärung stand bisher der Mangel an Ausgangsmaterial im Wege.

Im folgenden sollen die Pigmentzusammensetzung von *Mycobacterium phlei* und die Eigenschaften des Hauptcarotinoids Myxoxanthophyll (phlei) sowie einfache Methoden zur Gewinnung des Pigmentes beschrieben werden.

Methoden

1. Organismus und Kultur. *Mycobacterium phlei*¹ wurde in einem Medium kultiviert, das 5 g Pepton, 20 g Glucose, 5 g Glycerin, 2,5 g Na-citrat, 4 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄ und 1 g MgSO₄ · 7 H₂O pro Liter enthielt (modifiziert nach GOODWIN u. JAMIKORN 1956). Stammkulturen wurden auf demselben, durch 2% Agar verfestigten Medium gehalten. Zur Gewinnung größerer Mengen wurden die Bakterien in 3 L-Erlenmeyerkolben (mit 1 L Medium) bei 30° C auf einem Rundschüttler inkubiert. Pro 1 L Nährlösung wurden nach 48 Std 10 g Bakterien (Naßgewicht) geerntet. Diphenylamin wurde in konzentrierter alkoholischer Lösung vor dem Sterilisieren im Autoklaven zugesetzt.

2. Extraktion und Trennung in epi- und hypophasische Pigmente: Zur Extraktion wurden im Laufe der Untersuchung verschiedene Verfahren angewandt: a) Die übliche Methode zur Extraktion von Mycobakterien unter Reiben der nassen oder gefriergetrockneten Bakterien mit zwei Gewichtsteilen Glaspulver und verschiedenen Lösungsmitteln im Handmörser; dieses Verfahren ist an einen beträchtlichen Lösungsmittelverbrauch gebunden. So benötigten wir pro 1 g Bakterien (Tr. Gew.) 250 ml Methanol, 250 ml Petroläther und 50 ml Chloroform. b) Beim Anreiben der nassen oder trockenen Zellen mit alkalischem Methanol oder Pyridin ist der Lösungsmittelverbrauch geringer, aber gemeinsam mit den Pigmenten gehen Schleimstoffe in Lösung, deren Entfernung im weiteren Trennungsgang Schwierig-

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

¹ Der Stamm wurde von den Baltimore Biological Laboratories bezogen.

keiten bereitet. c) Als einfachstes und zur quantitativen Erfassung der Carotinoide am besten geeignetes Verfahren erwies sich schließlich eine Extraktion der nassen Zellen mit Methanol, Tetrahydrofuran und Petroläther: 10 g nasse Bakterien werden im Zentrifugenglas in 50 ml Methanol suspendiert und abzentrifugiert und nacheinander mit 30 ml Methanol, 3×30 ml Tetrahydrofuran, 30 ml Methanol und 2×30 ml Petroläther gewaschen.

In allen Fällen wurden die vereinigten Extrakte bei 40°C im Vakuum der Wasserstrahlpumpe auf etwa 50 ml eingeengt und zur Verseifung nach Zusatz von 50 ml 10%iger KOH in Methanol 2 Std bei 40°C geschüttelt. Nach erneutem Einengen auf 50 ml wurden 50 ml Petroläther zugefügt. Dieser tiefrot gefärbte Extrakt wurde im Scheidetrichter sechsmal mit Wasser gewaschen (zur Verhinderung der Emulgierung bei den ersten Waschungen unter Zusatz von 1% NaCl). Die Petrolätherphase enthielt eine Pigmentkomponente in Form amorpher Teilchen, die sich beim Auswaschen des Methanols vergrößerten. Beim anschließenden Ausschütteln der Petrolätherphase mit 90%igem wäßrigem Methanol ging ein Teil der Pigmente in die methanolische Phase über, während die Teilchenfraktion in der Petrolätherphase zurückblieb. Die vereinigten und auf 50 ml eingeengten Methanolextrakte wurden mit Chloroform aufgenommen und nach Waschen mit Wasser über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet (Hypophase). Die Petrolätherfraktion (Epiphase) wurde nach Entfernen des Methanols durch Waschen mit Wasser durch eine Säule (12×80 mm) von wasserfreiem Na_2SO_4 filtriert, wobei die Pigmentteilchen adsorbiert wurden; vom Natriumsulfat lassen sie sich mittels Pyridin oder Tetrahydrofuran leicht eluieren.

3. Chromatographische Trennung: a) Die epiphasischen Pigmente wurden aus Petroläther an Mischungen von aktivem und deaktiviertem Aluminiumoxyd Merck (GOODWIN 1952, GOODWIN u. JAMIKORN 1956) adsorbiert und mit Petroläther-Äther-Aceton-Gemischen eluiert. Zur weiteren Auftrennung machte sich in einigen Fällen die Chromatographie an MgO-Supercel (1 : 1) notwendig. b) Die Hypophase wurde aus Chloroform an gefälltes CaCO_3 adsorbiert; die Zonen wurden nach Ausstoßen und Zerlegen der Säule mit Methanol extrahiert.

Alle Manipulationen wurden bei gedämpftem Licht und rasch nacheinander ausgeführt. In polaren Lösungsmitteln sind die Pigmente äußerst labil; lediglich in Petroläther im Dunkeln erleiden sie keine nennenswerte Veränderung.

Die Absorptionskurven wurden mit einem Beckman-DU-Spektrophotometer aufgenommen, dessen Wellenlängenskala wir mit Hilfe einer Hg-Dampf-Lampe nachgecheckt hatten.

Beschreibung und Identifizierung der Pigmente

Wie Vorversuche ergeben hatten, ist die Pigmentzusammensetzung von *Mycobacterium phlei* von der Kultur abhängig. Auf Agar gezogene Zellen erscheinen tief dunkelrot, bei forcierter Belüftung oder in Schüttelkultur gewachsene Zellen zinnoberrot. Den stärksten Einfluß auf die Pigmentbildung hat Diphenylamin (DPA), dessen die Pigmentsynthese bei Bakterien hemmende Wirkung von KHARASCH u. Mitarb. (1936) entdeckt und von TURIAN (1950) auf einen Stamm von *Mycobacterium phlei* angewandt wurde. In einer $5,9 \cdot 10^{-5}$ M DPA/L enthaltenden Nährlösung gedeihen die Zellen nach reichlicher Beimpfung (1:10) ohne nennenswerte Beeinflussung des Wachstums, sind jedoch weniger intensiv gefärbt. Da die Pigmentausrüstung dieser Zellen qualitativ derjenigen der ohne DPA-Zusatz gezogenen Zellen entspricht, der Gehalt an

Carotinoiden aber auf Kosten der Oxycarotinoide erhöht ist, wurde die Charakterisierung der Pigmente an den in Gegenwart von DPA gewachsenen Zellen vorgenommen.

I. Epiphasische Carotinoide

Der gelborangefarbene Petrolätherextrakt (entsprechend 10 g Naßgewicht) wurde auf 20 ml eingengt und auf eine Säule (12 × 150 mm) einer Mischung von aktivem und deaktiviertem Aluminiumoxyd (1 : 1), die mit wasserfreiem Na₂SO₄ 15 mm hoch bedeckt war, gegossen. Das Eluat der Entwicklung mit Petroläther ist farblos; aus der tiefrot gefärbten oberen Zone der Säule trennt sich lediglich eine fluoreszierende Zone, Phytofluor, ab. Durch Zusatz steigender Mengen von Äthyläther zum Petroläther setzten sich die einzelnen Zonen voneinander ab; die Carotinoide wurden mit dem Ausfließenden aufgefangen. Nach Abdunsten des Petroläther-Äther-Gemisches im N₂-Strom wurden die einzelnen Fraktionen an MgO-Supercel (1 : 1) rechromatographiert und an Hand der relativen Stellung der Bande an der Säule und des Absorptionsspektrums sowie einfacher Nachweisverfahren identifiziert (Tab. 1).

Tabelle 1. Trennung der epiphasischen Carotinoide von *Mycobacterium phlei* (in Gegenwart von $5,9 \cdot 10^{-5}$ m DPA gewachsen)

Adsorptionsmittel: aktives und deaktiviertes Aluminiumoxyd (1 : 1), entwickelt mit Petroläther mit steigenden Mengen Äthyläther

Zone	Färbung	Abs. Maxima in Petroläther	Äther zur Elution (% v/v)	identifiziert als
E 1	farblos	275, 285, 297	0—1	Phytoen
E 2	grüne Fluoresz.	331, 348, 366	1—3	Phytofluor
E 3	gelb	423, 452, 480	3—5	β -Carotin
E 4	gelb	378, 399, 421	4—10	ζ -Carotin
E 5	orange	433, 458, 488	15	γ -Carotin
E 6	gelb	415, 437, 467	20—40	Neurosporin
E 7	violettorange	445, 469, 500	> 40	Lycopin

Phytoen ließ sich an Hand des typischen Absorptionsspektrums identifizieren. Phytofluor gab sich durch die gelbgrüne Fluoreszenz im UV-Licht und sein Absorptionsspektrum zu erkennen. Zur effektiven Trennung von β -Carotin und ζ -Carotin war eine dritte Trennung an Ca(OH)₂ notwendig. γ -Carotin wurde an seinem Absorptionsspektrum erkannt. Das Spektrum der nächsten Zone ist identisch mit dem, das HAXO (1949) für ein aus *Neurospora crassa* isoliertes Carotinoid angibt, welches oberhalb γ -Carotin und unterhalb Lycopin adsorbiert wird, und welches er Neurosporin nannte. Zwei Gipfel der Absorptionskurve haben nahezu die gleiche Höhe. Unser Pigment scheint nicht mit dem von GOODWIN u. JAMIKORN (1956) aufgefundenen khakifarbenen Pigment

identisch zu sein, das die Autoren auch als Neurosporin ansprachen. Für die Identität mit HAXO's Neurosporin spricht weiterhin das epiphasische Verhalten gegenüber 90%- und 95%igem wäßrigem Methanol und die blaue Farbreaktion mit konzentrierter H_2SO_4 . Der Adsorptionsstärke, der Gestalt der Absorptionskurve und den Extinktionsmaxima entsprechend, die einer aus Tomatenpaste nach WILLSTÄTTER und ESCHER (1910) präparierten Standardsubstanz gleichen, und Farbreaktionen handelt es sich bei dem Pigment der nächsten orange-violetten Zone um Lycopin; eine teilweise Umwandlung zu Neolycopin ist nicht ausgeschlossen.

II. Die Teilchenfraktion: *Myxoxanthophyll (phlei)*

Das Oxycarotinoid ist in Petroläther sehr wenig löslich und läßt sich daher leicht durch Adsorption an wasserfreies Natriumsulfat abtrennen. Von diesem läßt sich das Pigment mittels verschiedener Lösungsmittel (Methanol, Chloroform, Tetrahydrofuran, Pyridin) desorbieren, von denen Tetrahydrofuran die für die weitere Verarbeitung günstigsten Eigenschaften aufweist. Das Pigment wurde in wenig heißem Tetrahydrofuran aufgenommen; durch Zusatz von wenig (0,2 Vol. Teile) Äthyläther und 1 Vol. Teil Petroläther wird das Pigment in feinen Teilchen ausgefällt, die abzentrifugiert, mit Äther und Petroläther gewaschen, erneut in Tetrahydrofuran gelöst und mit wenig Äther und Petroläther in der Kälte ausgefällt wurden. Das mit Petroläther gewaschene Pigment wurde in verschiedenen Lösungsmitteln bei Zimmertemperatur (23° C) gelöst und Absorptionsmaxima und Extinktionen der gesättigten Lösungen bei der Wellenlänge der maximalen Extinktion bestimmt (Abb. 1 und Tab. 2).

Das Pigment ist unlöslich (bzw. weniger löslich als in Äther) in Petroläther, Benzol und Schwefelkohlenstoff; es ist mäßig löslich in Methanol, Äthanol, Aceton und Chloroform, gut löslich in Tetrahydrofuran, Diäthylformamid und Pyridin. Es zeichnet sich durch eine außerordentlich hohe Adsorptionskraft aus. Von Tetrahydrofuran wird es an Aluminiumoxyd mit solcher Stärke adsorbiert, daß es sich selbst mit Pyridin-Methanol nur teilweise ablösen läßt. Von Chloroform wird es an der obersten Schicht der $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - oder CaCO_3 -Säule festgehalten und wird selbst durch Chloroform-Äther, Äther oder Aceton nicht entwickelt. In Chloroform-Methanol-Mischungen wandert es als einheitliche Fraktion. Konzentrierte Schwefelsäure gibt mit dem in Chloroform gelösten Pigment eine tiefblaue Farbreaktion. Konzentrierte Salzsäure verursacht keinen Farbwechsel.

Durch langsame Abkühlung einer bei Zimmertemperatur halb gesättigten Lösung des Pigmentes auf -20°C schied sich das Pigment in feinen Sphäriten aus. Diese wurden auf einem Glassinterfilter mit Äther gewaschen, kurz trockengesaugt und mit Tetrahydrofuran in Lösung gebracht. Von 120 mg wurden nach fünfmaligem Umkristallisieren 13,2 mg

reine Substanz gewonnen, an der der Schmelzpunkt und der Extinktionswert (1 cm Schichtdicke) für eine 1%ige Lösung in Tetrahydrofuran bestimmt wurden. Der Schmelzpunkt des über Paraffin im Vakuum getrockneten Pigmentes wurde zu 184—186° C ermittelt. Die Extinktion

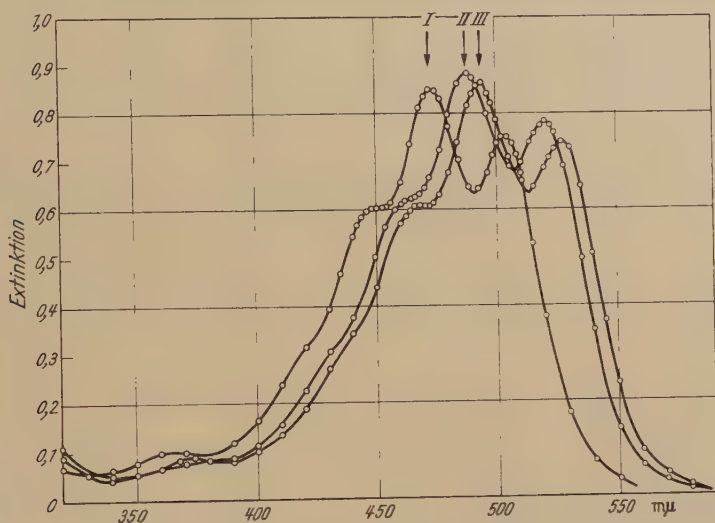


Abb. 1. Extinktionskurven von Myxoxanthophyll (phlei) in Methanol (I), Chloroform (II) und Pyridin (III)

Tabelle 2. Absorptionsmaxima und Extinktionen der mit Myxoxanthophyll (phlei) gesättigten Lösungen bei der Wellenlänge der maximalen Absorption

Lösungsmittel	Absorptionsmaxima (mμ)			$E_{1\text{ cm}}^{\text{ gesättigt}}$	bei λ (mμ)
Methanol	(449),	473,	503	5,1	473
Äther	(447),	474,	504	0,24	474
Aceton	(453),	477,	508	8,3	477
Tetrahydrofuran	456 ,	482,	514	288	482
Chloroform	(460),	488,	520	10,6	488
Pyridin	467 ,	493,5,	527	1550	493,5

wurde für die Präparate nach jedem Reinigungsschritt bestimmt und nach der dritten bis fünften Kristallisation für konstant befunden. In Tetrahydrofuran beträgt $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2030$.

Das Pigment kommt in seinen Eigenschaften zwei Oxycarotinoiden nahe, die bisher nur in Cyanophyceen aufgefunden wurden: Myxoxanthophyll in *Oscillatoria rubescens* (HEILBRON u. LYTHGOE 1936) und Aphanizophyll in *Aphanizomenon flos-aquae* (TISCHER 1938). TISCHER sah die beiden Pigmente als nicht identisch an. KARRER und RUTSCHMANN (1944)

isolierten das Pigment aus *Oscillatoria rubescens* erneut und kristallisierten es aus Pyridin und Aceton in roten Nadeln (Sm 182). Nach meinen Erfahrungen ist das Pigment sehr instabil und verliert, besonders in Kontakt mit Wasser und polaren Lösungsmitteln, rasch seine hohe Adsorptionskraft. Es nimmt dabei die Eigenschaften des unten beschriebenen hypophasischen Pigmentes an, das offenbar lediglich ein Abbauprodukt unseres Pigmentes darstellt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß alle Untersucher das gleiche Pigment in den Händen hatten, das jedoch in verschiedenem Grade durch Abbauprodukte verunreinigt war.

Tabelle 3. *Absorptionsmaxima und Schmelzpunkte von Myxoxanthophyll*

Lösungsmittel	Myxoxanthophyll (phlei)	Myxoxanthophyll (HEILBRON u. LYTGOE)	Aphanizophyll (TISCHER)
Methanol	(449), 473, 503	445, 471, 503 ¹	444, 475, 507
Chloroform	(460), 488, 520	454, 484.5, 518	457, 487.5, 523
Pyridin	467, 493.5, 527	458, 489, 526	462, 494, 531
Schmelzpunkt	184—186	169—170 (182) ²	172—173

¹ in Äthanol gemessen. ² nach KARRER u. RUTSCHMANN (1944)

Da die bisher in der Literatur mitgeteilten und meine eigenen Daten (Tab.3) die Identität der beschriebenen Pigmente sehr wahrscheinlich machen, soll das aus *Mycobacterium phlei* isolierte Pigment als Myxoxanthophyll (phlei) bezeichnet werden.

III. Hypophasische Pigmente

Die in Chloroform aufgenommene und getrocknete Hypophasenfraktion wurde an eine CaCO₃-Säule adsorbiert und mit Chloroform und steigenden Mengen Aceton entwickelt. Es erfolgt eine Auftrennung in fünf Zonen. Die eluierten Pigmente besitzen nahezu die gleichen Absorptionsmaxima (448—453, 474—475, 503—504 m μ in Äthanol) und unterscheiden sich lediglich durch ihre Adsorptionsstärke. Die Übereinstimmung der Absorptionsmaxima mit denen des Myxoxanthophylls (phlei) und die Tatsache, daß auch Myxoxanthophyll nach mehrtägigem Stehen die hohe Adsorptionskraft verliert und bei der Chromatographie an CaCO₃ in fünf Zonen aufgetrennt wird, lassen vermuten, daß das Hypophasenpigment eine Mischung von verschiedenen isomeren Abbauprodukten von Myxoxanthophyll darstellt.

Quantitative Zusammensetzung

Zur Ermittlung des Gehaltes der Zellen an den einzelnen Carotinoiden wurde in prinzipiell der gleichen Weise verfahren wie bei der qualitativen Charakterisierung; jedoch wurden kleinere und zahlreiche Fraktionen aufgefangen und die Gehalte addiert. Die Hypophasenfraktion, die wir als Abbauprodukt von Myxoxanthophyll ansehen, und die im normalen Extraktionsgang nur 1–3% des letzteren ausmacht, wurde verworfen.

In Tab. 4 sind einige quantitative Angaben zusammengestellt. Zunächst fällt der hohe Gesamt-Carotinoid-Gehalt von etwa 10 mg pro g Trockengewicht Bakterien auf, der den von *Trentepohlia aurata* erreicht. Davon entfallen 95% auf das Oxycarotinoid Myxoxanthophyll, nur 5% des Gesamt-Gehaltes liegen in Form der reinen sauerstofffreien Carotinoide vor.

Von einer die Carotinoidbildung hemmenden Wirkung des Diphenylamins kann in diesem Falle nicht gesprochen werden. Bei allen untersuchten Stämmen wird der Gesamtgehalt durch DPA heraufgesetzt. Die

Tabelle 4. Die quantitative Carotinoidzusammensetzung von *Mycobacterium phlei* nach dreitägiger Schüttelkultur bei 30° C ohne und mit $5,9 \cdot 10^{-5}$ m. DPA. Zahlenangaben in $\mu\text{g}/1$ g Trockengewicht

Fraktion	$E^{1\%}_{1\text{ cm}}$	bei λ (m μ)	ohne DPA	mit DPA
Phytoen	850	285	—	2300
Phytofluon	1500	348	24	238
β -Carotin	2500	452	28	101
ξ -Carotin	2270	399	18	140
γ -Carotin	2720	458	220	830
Neurospodin	2990	437	65	210
Lycopin	3470	469	180	315
Epiphase, gesamt			535	4134
Myxoxanthophyll (phlei)	2030	482	9480	6880
Gesamt-Carotinoide			10015	11014

Die der Errechnung der Carotinoidmengen zugrundegelegten Daten wurden entnommen: Phytoen nach RABOURN u. QUACKENBUSH (1953, 1956); Phytofluon nach WALLACE u. PORTER (1952), die übrigen Werte aus GOODWIN (1955). Die Extinktionen der epiphasischen Carotinoide wurden in Petroläther bestimmt, die von Myxoxanthophyll (phlei) in Tetrahydrofuran.

wesentliche Wirkung des DPA besteht in der Förderung der Anreicherung der mehr reduzierten Carotinoide, insbesondere der im Ultraviolett absorbierenden, auf Kosten des Oxycarotinoids. Falls die Biosynthese im Sinne des Porter-Lincoln-Schemas verläuft (PORTER u. LINCOLN 1950), hat man dem DPA nicht eine die Carotinoidsynthese hemmende, sondern lediglich eine antioxydative Wirkung zuzuschreiben.

Diskussion

Obwohl bereits mehrere Untersuchungen über die Pigmentzusammensetzung von Stämmen von *Mycobacterium phlei* vorliegen (INGRAHAM und STEENBOCK 1935, GRUNDMANN u. TAKEDA 1937, TAKEDA u. OHTA 1939, 1940, TURIAN 1950 a, b, c, 1951, TURIAN u. HAXO 1952, GOODWIN u. JAMIKORN 1956) ist bisher kein Stamm bekannt geworden, der ein dem Myxoxanthophyll ähnliches Oxycarotinoid enthält. Die Annahme, daß

unser aus Bakterien isoliertes Pigment mit dem Blaualgenpigment Myxoxanthophyll identisch ist, gründet sich auf die Übereinstimmung der Absorptionsmaxima, des Schmelzpunktes, des Löslichkeitsverhaltens und zahlreicher Eigenschaften, die insbesondere von TISCHER (1938) eingehend dargestellt worden sind. Wenn man auf Grund der bisher vorliegenden Daten die beiden Pigmente Myxoxanthophyll und Aphanizophyll für identisch hält (GOODWIN 1957), kann an der Identität unseres Pigmentes mit dem Blaualgenpigment kein Zweifel bestehen.

Die Auffindung von Myxoxanthophyll in *Mycobacterium phlei* legt Spekulationen über die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen Bakterien und Blaualgen nahe. STANIER u. VAN NIEL (1941) stellten die Ähnlichkeit beider Gruppen heraus, sich dabei im wesentlichen auf negative Merkmale stützend (keine wahren Zellkerne, keine geschlechtliche Vermehrung, keine Plastiden). Neben anderen biochemischen Ähnlichkeiten ließe sich als weiteres Argument die Tatsache anführen, daß weder in Bakterien (ASSELINEAU 1957) noch in Blaualgen (CARTER, HEILBRON u. LYTHGOE 1939, HEILBRON 1942) Steroide aufgefunden wurden. Obwohl bisher der Vergleich der Pigmentzusammensetzung beider Gruppen keine Anhaltspunkte für verwandtschaftliche Beziehungen ergeben hat (PRINGSHEIM 1949), könnte man das Vorkommen des typischen Blaualgenpigmentes Myxoxanthophyll in Mycobakterien als einen ersten Hinweis ansehen.

Die Folgerungen, zu denen die quantitative Analyse des Carotinoidgehaltes von normalen und in Gegenwart von Diphenylamin gewachsenen Zellen führen, sollen in anderem Zusammenhang dargestellt werden.

Zusammenfassung

In einem carotinoidreichen Stamm von *Mycobacterium phlei* wurde neben den Carotinoiden Phytoen, Phytofluen, ζ -Carotin, Neurosporin, Lycopin, α - und β -Carotin ein Oxycarotinoid aufgefunden, das mit dem Blaualgenpigment Myxoxanthophyll (= Aphanizophyll) identisch zu sein scheint. Der Gehalt an Carotinoiden beträgt 1% des Trockengewichtes der Bakterien; davon liegen 95% in Form des Oxycarotinoids vor. Myxoxanthophyll wurde aus Tetrahydrofuran-Petroläther mehrmals umkristallisiert und charakterisiert.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Gewährung eines Fortbildungsstipendiums und der Anti-Tuberculosis-League of CUYAHOGA-County für Forschungsmittel. Die Arbeit wurde während eines Studienaufenthaltes im Department of Mikrobiology (Dir. Dr. L. O. KRAMPITZ), School of Medicine, Western Reserve University, Cleveland, Ohio, durchgeführt.

Literatur

- ASSELINEAU, J.: In W. RUHLAND, Handbuch der Pflanzenphysiologie 7, 90—108 (1957).
 CARTER, P. W., I. M. HEILBRON u. B. LYTHGOE: Proc. Roy. Soc. Lond. 128, 82—109 (1939).

GOODWIN, T. W.: *Biochem. J.* **50**, 550—558 (1952). — Carotenoids, in PAECH, K., und M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* **3**, 272—311 (1955). — *J. gen. Microbiol.* **17**, 467—473 (1957). — GOODWIN, T. W., u. M. JAMIKORN: *Biochem. J.* **62**, 269—275 (1956). — GRUNDMANN, C., u. Y. TAKEDA: *Naturwissenschaften* **25**, 27 (1937).

HAXO, F.: *Arch. Biochem.* **20**, 400—421 (1949). — HEILBRON, I. M.: *J. Chem. Soc. London* **1942**, 79—89. — HEILBRON, I. M., u. B. LYTHGOE: *J. Chem. Soc. London* **1936**, 1376—1380.

INGRAHAM, M. A., u. H. STEENBOCK: *Biochem. J.* **29**, 2553—2562 (1935).

KARRER, P., u. J. RUTSCHMANN: *Helv. chim. Acta* **27**, 1691—1695 (1944). — KHARASCH, M. S., E. A. CONWAY u. W. BLOOM: *J. Bact.* **32**, 533—540 (1936).

PORTER, J. W., u. R. E. LINCOLN: *Arch. Biochem.* **27**, 390—403 (1950). — PRINGSHEIM, E. G.: *Bact. Rev.* **13**, 47—98 (1949).

RABOURN, W. J., u. F. W. QUACKENBUSH: *Arch. Biochem.* **44**, 159—164 (1953); **61**, 111—118 (1956).

STANIER, R. Y., u. C. B. VAN NIEL: *J. Bact.* **42**, 437—466 (1941).

TAKEDA, Y., u. T. OHTA: *Zt. physiol. Chemie* **258**, 6—8 (1939); **265**, 233—236 (1940). — TISCHER, J.: *Zt. physiol. Chemie* **251**, 109—128 (1938). — TURIAN, G.: *Helv. chim. Acta* **33**, 13—16, 1303—1307, 1988—1993 (1950); **34**, 1060—1064 (1951). — TURIAN, G., u. F. HAXO: *J. Bact.* **63**, 690—691 (1952).

WALLACE, V., u. J. W. PORTER: *Arch. Biochem.* **36**, 468—472 (1952). — WILLSTÄTTER, R., u. H. H. ESCHER: *Zt. physiol. Chemie* **64**, 47—61 (1910).

(De l'Institut et du Jardin botaniques de l'Université, Berne
et du Laboratoire de chimie biologique de l'Université, Genève)

Action d'anti-inositols sur *Neurospora crassa* «inositolless» cultivé en milieu hautement purifié*

Par

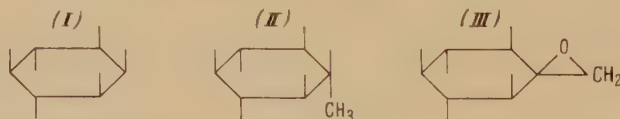
W. H. SCHOPFER et TH. POSTERNAK

(Eingegangen am 28. Mai 1958)

L'action d'un facteur de croissance vitaminique peut être plus aisément étudiée si l'on connaît son antivitamine, substance de constitution très voisine; cette dernière agit compétitivement avec la vitamine requise comme facteur de croissance par un microorganisme et détermine une inhibition de son développement.

On connaît les antagonistes de la plupart des vitamines. Nous les avons récemment mis en évidence pour le méso-inositol (MI) (I) dont certains dérivés ont une forte action inhibitrice sur quelques micro-organismes exigeant le MI comme facteur essentiel. Parmi les plus actifs, citons l'isomytilitol (II) (IMy), l'oxyde de méthylène-pentahydroxycyclohexane (OMPH) (III) et l'oxyde de propylidène-pentahydroxycyclohexane (SCHOPFER et POSTERNAK 1954, POSTERNAK et SCHOPFER 1955).

Les indices d'inhibition sont les suivants:
isomytilitol 30,8. — Oxyde de méthylène-pentahydroxycyclohexane 15,8. — oxyde de propylidène-pentahydroxycyclohexane 3,85,



(les atomes d'H fixés au noyau ne sont pas indiqués, mais uniquement les groupes OH).

Le mésoinositol supprime l'effet des inhibiteurs. Il s'agit très probablement d'un antagonisme compétitif.

D'autre part, nous avons montré que l'isomytilitol est incorporé dans les phospholipides à inositol de *N. crassa* «inositolless» constituant ainsi des phospholipides mixtes à inositol et isomytilitol (POSTERNAK et SCHOPFER 1957).

La première démonstration d'une action anti-inositol est généralement effectuée à l'aide de microorganismes. Dans ce cas il est essentiel que les

* Professor Dr. h. c. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag gewidmet.

milieux de cultures utilisés, synthétiques, ne donnent lieu à aucune critique et soient aussi complètement que possible dépourvus d'impuretés.

Des expériences effectuées avec des plantes supérieures ont rendu vraisemblable l'intervention d'éléments traces lors de l'action des anti-inositols. Il est donc important de vérifier si ces éléments jouent également un rôle dans nos expériences sur *N. crassa*. Les impuretés peuvent être apportées par l'eau distillée ordinaire, par le glucose, l'inositol lui-même qui est une substance naturelle, par les anti-inositols et par d'autres constituants du milieu.

D'autre part les effets d'anti-vitamines doivent être étudiés à l'aide de vitamines synthétiques ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été le cas pour le mésoinositol.

Les expériences entreprises ont pour but de combler ces lacunes.

Composition du milieu (p. litre): glucose pur privé de vitamines, Roche 15 g, tartrate de NH_4 pro. anal. Judex 5 g, nitrate de NH_4 pro. anal. Merck 1 g, KH_2PO_4 pro. anal. Merck 2,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ idem 0,5 g, NaCl idem 0,5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ idem 0,1 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ puris. pro anal. Siegfried 0,005 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ pro anal. Merck 0,002 g, Biotine 2 γ .

Traitement du milieu. Les solutions à purifier sont agitées longuement, à plusieurs reprises, avec de la dithizone (10 mg-%) puis avec de la 8-oxyquinoline (20 mg-%) en solution chloroformique. Les solutions sont lavées ensuite plusieurs fois avec du chloroforme (Merck). Elles sont enfin soumises à la distillation afin d'éliminer les dernières traces de chloroforme. Il est important que ce traitement soit fait à fond afin de faire disparaître les dernières traces de complexants et de solvant.

Sont soumises au traitement: l'eau distillée livrée par un échangeur d'ions, les solutions de glucose, de tartrate de NH_4 , d'inositol naturel ou synthétique¹, d'IMy et d'OMPH.

Le tartrate et l'IMy sont stérilisés à chaud isolément, l'OMPH à froid par filtration.

Les expériences sont effectuées dans des Erlenmeyers Pyrex avec 10 cm³ de milieu, à une température constante de 29° et à l'obscurité. Les thalles sont, après dessiccation, pesés à la balance analytique.

Organisme utilisé. *Neurospora crassa* «inositolless» mutant no. 64,001 (BEADLE et TATUM 1945). Toutes les expériences se font à triple.

Pour les expériences d'inhibition chaque culture reçoit 20 γ de MI p. 10 cm³ puis des doses croissantes d'inhibiteur (antivitamine) dans toute la série. Pour les expériences de désinhibition chaque culture contient 20 γ de MI (inositol de base) et une dose constante d'antivitamine déterminant une inhibition marquée mais pas complète; la série reçoit en plus des doses croissantes de MI.

Les expériences se font avec du MI naturel ou synthétique non traité (n. tr.) ou traité (tr.) par les complexants. Les inhibiteurs sont traités.

Nous déterminons graphiquement les taux d'inhibition et les taux de désinhibition c.à.d. les doses d'antivitamine déterminant une

¹ L'inositol synthétique est celui préparé par l'un de nous (POSTERNAK; POSTERNAK, SCHOPFER et HUGUENIN 1957).

Tableau 1. *Isomytilitol*
Inhibition

	isomytilitol				
	0	0,5 mg	1 mg	5 mg	7,5 mg
MI nat. n. tr. .	18,3 mg (100)	53,2 %	27,3 %	20,2 %	16,5 %
MI nat. tr. . .	15,7 mg (100)	63,7 %	38,1 %	21,2 %	10,5 %
MI synth. n. tr.	17,7 mg (100)	53,1 %	26,6 %	15,2 %	9,2 %
MI synth. tr. .	17,7 mg (100)	55,0 %	27,4 %	15,2 %	10,0 %

Désinhibition

	inositol traité				
	0	10 γ	25 γ	50 γ	100 γ
MI nat. n. tr. .	20 mg (100)	29,8 %	47,5 %	66,5 %	70,0 %
MI nat. tr. . .	20,4 mg (100)	32,4 %	49,0 %	68,5 %	72,0 %
MI synth. n. tr.	19,3 mg (100)	33,4 %	48,0 %	70,0 %	76,0 %
MI synth. tr. .	19,0 mg (100)	34 %	49,5 %	69,0 %	76,0 %

Tableau 2. *Oxyde de méthylène-pentahydroxycyclohexane*

Inhibition

	oxyde de méthylène-pentahydroxycyclohexane			
	0	0,1 mg	0,5 mg	1,0 mg
MI nat. n. tr. .	21,5 mg (100)	56,4 %	12,4 %	10,8 %
MI nat. tr. . .	16,6 mg (100)	64,7 %	16,4 %	14,0 %
MI synth. n. tr.	15,2 mg (100)	57,5 %	12,7 %	8,0 %
MI synth. tr. .	15,5 mg (100)	56,3 %	15,0 %	14,8 %

Désinhibition

	inositol traité				
	0	10 γ	25 γ	50 γ	100 γ
MI nat. n. tr. .	30,0 mg (100)	42,3 %	60 %	64,5 %	66,0 %
MI nat. tr. . .	30,7 mg (100)	42,3 %	54,5 %	61,0 %	64,0 %
MI synth. n. tr.	30,0 mg (100)	41,0 %	57,7 %	65,0 %	67,5 %
MI synth. tr. .	30,0 mg (100)	41,0 %	56,7 %	63,5 %	66,7 %

inhibition ou une désinhibition de 50% par rapport au contrôle ne contenant que 20γ de MI. Nous calculons ensuite les indices d'inhibition ou de désinhibition, soit les rapports antivitamine: vitamine lorsque les cultures sont inhibées ou désinhibées de 50 % par rapport au contrôle.

Ces chiffres, obtenus avec le mutant 64,001 sont du même ordre de grandeur que ceux que nous avons obtenus avec le mutant usuel 9683. Ils en diffèrent pourtant un peu. Il est d'ailleurs difficile, avec ces

mutants, d'obtenir dans des expériences successives, des chiffres identiques. Nous relevons à nouveau que, dans les conditions de nos expériences, les indices pour l'isomytilitol, inhibition et désinhibition, sont très voisins. Ils le sont moins pour l'OMPH.

On relève un fait intéressant: pour l'IMy comme pour l'OMPH les indices d'inhibition sont nettement plus élevés avec l'inositol naturel traité, qu'avec le non traité. Il semble donc que le traitement par les

Tableau 3. *Taux et indices d'inhibition et de désinhibition*

	Inhibition		désinhibition	
	taux	indice	taux	indice
Isomytilitol				
MI nat. n. tr.	550 γ	27	28,25 γ	31,2
MI nat. tr.	750 γ	37,5	26,25 γ	32,5
MI synth. n. tr.	675 γ	28,7	27,00 γ	32,0
MI synth. tr.	600 γ	30,0	25,00 γ	33,3
Oxyde de méthylène-pentahydroxycyclohexane				
MI nat. n. tr.	160 γ	8	16,5 γ	13,7
MI nat. tr.	220 γ	11	18,75 γ	12,9
MI synth. n. tr.	177,5 γ	8,9	18,0 γ	13,2
MI synth. tr.	170 γ	9,5	17,99 γ	13,2

agents complexants enlève à l'inositol nat. une substance augmentant l'activité des deux anti-inositols. Ce phénomène ne se remarque pas lors de la désinhibition, celle-ci s'effectuant dans les deux cas avec de l'inositol traité.

Conclusions

L'effet anti-inositol de l'isomytilitol et de l'oxyde de méthylène-pentahydroxycyclohexane sur *Neurospora crassa* «inositolless» est donc confirmé dans des conditions culturales donnant toutes garanties. Les légères différences observées ne nous imposent pas de modifier nos précédentes conclusions. Les résultats obtenus avec de l'inositol synthétique concordent avec ceux que nous a fournis l'inositol naturel.

Ces recherches ont été effectuées avec l'aide du Fonds National Suisse pour la Recherche scientifique, que nous remercions. Nous sommes reconnaissants au Dr. TATUM de l'envoi de la souche utilisée et à Mademoiselle R. ARMBRUSTER de sa collaboration dans l'exécution des expériences.

Travaux cités.

SCHOPFER, W. H., et TH. POSTERNAK: *Helv. physiol. pharmacol. Acta*, **12**, C 30 (1954). — POSTERNAK, TH., et W. H. SCHOPFER: 3ème congr. intern. de Biochimie, Bruxelles 1955, résumé des communications, section 1, p. 1. — POSTERNAK, TH., et W. H. SCHOPFER: *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* **39**, 1037 (1957). — POSTERNAK, TH., W. H. SCHOPFER et R. HUGUENIN: *Helv. chim. Acta* **40**, 1875 (1957).

(Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Bonn)

Der Einfluß von Mg-Mangel auf die Fett- und Eiweißbildung von *Endomycopsis vernalis**

Von

MAXIMILIAN STEINER, HORST KATING und URSULA JENDRALSKI¹

(Eingegangen am 11. 4. 1958)

In einer Reihe früherer Arbeiten (M. STEINER 1938, S. HEIDE 1939, H. RAAF 1941, M. MAAS-FÖRSTER 1955) wurde der Einfluß von N-, S-, P- und K-Mangel auf die Fett- und Eiweißbildung von *Endomycopsis vernalis* untersucht. Über die Ergebnisse dieser Arbeiten gab vor kurzem M. STEINER (1957, insbesondere S. 239f.) eine zusammenfassende Darstellung. An der gleichen Stelle wurde auch über die einschlägigen Arbeiten anderer Untersucher berichtet, die zum Teil mit anderen Mikroorganismen durchgeführt wurden.

Bei Mg-Mangelkulturen von *Endomycopsis* konnten wir in der Regel eine deutliche Hemmung der Fettbildung feststellen. Die Ergebnisse einer solchen Versuchsreihe wurden bereits von M. STEINER (1957) mitgeteilt, es wurden aber gelegentlich, bei abgeänderten Versuchsbedingungen, auch weniger klare, zuweilen sogar widersprechende Resultate gefunden. Es schien also wünschenswert, in weiteren Versuchen die Wirkung von Mg-Mangel eingehender zu studieren und dabei nicht nur die Fett-, sondern auch die Eiweißbildung analytisch zu erfassen und die Substanzbildung im zeitlichen Ablauf der Kultur zu berücksichtigen.

Die Angaben der Literatur über den Einfluß der Mg-Versorgung auf die Substanzbildung, insbesondere die Fettproduktion bei Mikroorganismen, sind spärlich und widerspruchsvoll. L. D. MACLEOD und I. SMEDLEY-MACLEAN (1938) fanden, daß die Fettbildung ruhender Hefezellen aus Acetat oder Glukose durch Mg^{++} und Ca^{++} vermindert wird. Demgegenüber konnte A. KLEINZELLER (1944) keinen Einfluß von Mg-Ionen auf die Fettsynthese aus Zucker durch ruhende *Torulopsis lipofera*-Zellen feststellen. L. B. LOCKWOOD, G. E. WARD, O. F. MAY, H. T. HERRICK und H. T. O'NEILL (1934) untersuchten die Fettbildung des *Penicillium javanicum* auf Nährlösungen, deren Gehalt an $MgSO_4$ zwischen 0,125 und 16% variiert wurde. Die Schwankungen des prozentualen Fettgehaltes waren ziemlich regellos. Nur extrem hohe Mg-Gaben (8—16% $MgSO_4$) führten zu einer starken Minderung des Fettgehaltes der Mycelien. J. M. GARRIDO, M. WOODBINE und TH. WALKER (1953) fanden bei ihren Versuchen mit Kulturen von *Aspergillus nidulans* wiederum eine

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

¹ Unter Verwendung einiger unveröffentlichter Ergebnisse von M. MAAS-FÖRSTER.

Steigerung der Fettproduktion bei zunehmender MgSO_4 -Gabe. Den Einfluß steigender Mg^{++} -Konzentration auf den Zuckerverbrauch und die Sterinbildung von *Aspergillus niger* untersuchte P. MANCEAU (1931). Zur Mg-haltigen Raulin-Lösung wurden zusätzliche Mg-Gaben (0,0–0,3 g MgCl_2 anhydr./100 ml) zugefügt. Ein nennenswerter Effekt wurde nicht beobachtet. Mit dem gleichen Organismus experimentierte R. RAVEUX (1954). Bei variiertem Mg-Gabe wurde die Produktion an Gesamttrockensubstanz, an Eiweißstoffen, Nucleinsäuren, acetonlöslichen Lipoiden, Phosphatiden und Kohlenhydraten (einschließlich Polyolen) bestimmt. Soweit die Ergebnisse zu unseren Untersuchungen in Beziehung stehen, wird weiter unten (S. 253) darauf einzugehen sein.

I. Material und Methodik

Als Versuchsorganismus diente der auch in den früheren Arbeiten unseres Laboratoriums verwendete Stamm von *Endomycopsis vernalis*.

Die Kulturen wurden nach der von S. HEIDE (1939) und M. MAAS-FÖRSTER (1955) beschriebenen Methode angesetzt. Die Nährlösung nach WÖLTJE wurde dem Versuchsziel entsprechend abgeändert:

statt 1% Asparagin auch 0,25% Asparagin ($\frac{1}{1}$ N⁺⁺ bzw. $\frac{1}{4}$ N⁺⁺),

statt $\frac{1}{1}$ Mg (0,25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$): $\frac{1}{5}$ Mg, $\frac{1}{25}$ Mg ... $\frac{1}{500}$ Mg.

Die entsprechenden Absolutmengen an Mg^{++} sind

$\frac{1}{1}$ Mg = 3700 γ je Kultur (15 ml) bzw. 247 γ je ml; $\frac{1}{5}$ Mg = 470 γ bzw. 49 γ ;
 $\frac{1}{25}$ Mg = 148 γ bzw. 9,8 γ ; $\frac{1}{125}$ Mg = 29,6 γ bzw. 2,0 γ ; $\frac{1}{500}$ Mg = 7,4 γ bzw. 0,5 γ .

In allen Fällen, außer bei $\frac{1}{1}$ Mg, wurde der Sulfatgehalt durch äquivalente Mengen von $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ zur Norm ergänzt. Alle Kulturen hatten also die gleiche Gesamtionenkonzentration und die gleiche SO_4^{--} -Gabe.

Der Fettgehalt wurde (nach S. HEIDE 1939) durch Ätherextraktion des mit Kieselgur feinst zerriebenen Trockenpilzes, der Gesamt-N-Gehalt nach KJELDAHL bestimmt. Der „Proteingehalt“ errechnete sich als „Gesamt-N“ $\cdot$ 6,25.

Die Analysenangaben sind, wenn nicht anders vermerkt, Mittelwerte von 3 Parallelkulturen.

II. Die Wirkung von Mg-Mangel bei geringer N-Gabe

Die in der Einleitung erwähnte Hemmwirkung von Mg-Mangel auf die Fettbildung von *Endomycopsis vernalis* sei zunächst durch eine Versuchsreihe belegt, bei welcher durch leichten N-Mangel Bedingungen geschaffen wurden, die nach früheren Erfahrungen (S. HEIDE 1939, S. RAAF 1941) für eine gute Fettbildung günstig sind¹.

Die Analysendaten stimmten für Trockengewicht, absoluten und prozentualen Fettgehalt bei den ersten drei Gliedern der Reihe — $\frac{1}{1}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{25}$ Mg — innerhalb der üblichen individuellen Schwankungsbreite überein (Tab. 1). Die Wöltje-Lösung normaler Zusammensetzung enthält also ein Überangebot an Mg, welches ohne sichtbare Folgen für den Verwendungsstoffwechsel von *Endomycopsis* auf $\frac{1}{25}$ der Normalmenge vermindert werden kann. Erst bei $\frac{1}{125}$ Mg macht sich am 4. Versuchstag eine Mangelwirkung geltend: Das Trockengewicht ist deutlich, der Fettgehalt (mg und % v. Trg.) schwach verringert. Diese Unterschiede wären noch deutlicher, wenn die erste der Kulturen, die mit ihren

¹ Die Ergebnisse einer anderen Versuchsreihe ähnlicher Art wurden von M. STEINER (1957) mitgeteilt.

Analysenwerten nach oben aus der Reihe fällt, bei der Mittelbildung unberücksichtigt bliebe¹. Am 8. Versuchstag hat sich das Trockengewicht der 1/125 Mg-Reihe den übrigen Reihen angeglichen; der Fettgehalt ist weiter angestiegen; er erreicht nunmehr die Werte der Kulturen mit 1/1—1/25 Mg. Um bessere Einsichten in die Auswirkungen von Mg-Mangel zu erhalten, muß offensichtlich noch mit geringeren Mg-Gaben als 1/125 experimentiert werden.

Tabelle 1. *Endomycopsis vernalis*.

Kulturaufwöltje-Lösung mit 0,25% Asparagin und a) 1/1, b) 1/5, c) 1/25, d) 1/125 Mg.
Ernte und Aufarbeitung nach 4 und 8 Tagen. Je 3 Parallelkulturen

Mg-Gabe		a) 1/1 Mg		b) 1/5 Mg		c) 1/25 Mg		d) 1/125 Mg	
Ernte nach Tagen		4	8	4	8	4	8	4	8
Trockengewicht mg		307,1	—	319,9	328,9	326,5	320,9	287,1	316,6
		322,1	330,0	322,9	310,1	320,6	331,9	212,0	320,9
		314,4	327,5	314,3	326,5	325,8	322,7	208,8	306,2
	Mittel	314,5	328,5	319,0	321,8	324,3	325,1	235,9	314,5
Fett mg		—	—	154,0	135,5	156,1	146,3	137,8	145,4
		157,8	143,1	151,7	136,0	154,5	149,6	89,5	146,2
		140,2	143,0	149,6	138,1	156,1	141,4	90,9	141,4
	Mittel	149,0	143,0	151,7	136,5	155,5	145,7	105,7	144,3
Fett % v. Trg.		—	—	48,3	41,2	48,3	45,6	47,6	46,0
		49,0	43,4	47,0	44,0	48,4	45,1	42,2	45,5
		53,3	43,8	47,6	42,5	49,4	43,8	43,3	46,2
	Mittel	47,3	43,6	47,6	42,5	48,7	44,8	44,3	45,9

Die Ergebnisse eines solchen Versuches, der außerdem noch die Substanzbildung im zeitlichen Verlauf verfolgt, sind in Tab. 2 dargestellt. Die Ergebnisse bestätigen zunächst die in Tab. 1 mitgeteilten Befunde. Wiederum lassen die Reihen mit 1/1, 1/5 und 1/25 Mg während der ganzen Versuchsdauer keine wesentlichen Unterschiede erkennen; merkliche Mg-Mangelwirkungen treten erst bei 1/125 und 1/500 Mg auf. Hier sind sowohl die Assimilation des Stickstoffs als auch die Fettbildung zunächst stark gehemmt. Die Synthese N-haltiger Bausteine zeigt nur eine anfängliche Hemmung. Und selbst diese Feststellung gilt nur für die Absolutmengen des in die Zellen eingebauten N und nur während der drei ersten Tage des Versuches; in bezug auf den prozentualen N-Gehalt sind die

¹ Es ist bemerkenswert, daß bei den Versuchsreihen mit extremem Mg-Mangel immer wieder einzelne Kulturen Analysenwerte für Trockensubstanz, Fettgehalt usw. lieferten, die deutlich nach oben „aus der Reihe“ fielen. Das ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, wie klein die absoluten, je Kultur zugefügten Mg-Mengen sind: z. B. 2,0 γ /ml bei 1/125 Mg, 0,5 γ /ml bei 1/500 Mg. Unkontrollierbare Spuren von Mg, die durch das Filterpapier, den Quarzsand oder aus dem Glas der Petrischale ins Substrat gelangen, müssen natürlich stark ins Gewicht fallen.

Tabelle 2. *Endomycopsis vernalis*
Kultur auf Wöltje-Lösung mit 0,25% Asparagin und a) 1/1, b) 1/5, c) 1/25, d) 1/125, e) 1/500 Mg
Ernte nach 54, 61, 66, 85, 108, 162 Std. Mittelwert von je 3 Kulturschalen

Alter der Kultur	Mg-Gabe																			
	Trockengewicht mg					Gesamt-N mg (% v. Trig.)					Fett mg (% v. Trig.)					Gesamt-N im Medium mg				
	1/1	1/5	1/25	1/125	1/500	1/1	1/5	1/25	1/125	1/500	1/1	1/5	1/25	1/125	1/500	1/1	1/5	1/25	1/125	1/500
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Std	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
54	23,8	26,2	26,1	12,3	15,4	1,42 (5,97)	1,45 (5,53)	1,30 (5,00)	0,66 (5,36)	0,89 (5,79)	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	3,60	3,40	3,58	4,40
61	93,1	88,6	95,1	71,6	64,8	3,98 (4,31)	4,03 (4,54)	4,16 (4,40)	3,80 (5,32)	3,31 (5,11)	9,67 (10,5)	9,25 (10,7)	11,8 (12,4)	4,61 (6,4)	4,35 (6,7)	1,05	1,06	0,87	1,33	1,74
66	122,0	127,0	120,5	98,7	86,5	4,25 (3,48)	4,45 (3,51)	4,16 (3,45)	4,06 (4,13)	3,75 (4,32)	21,7 (17,8)	20,4 (16,4)	21,0 (17,5)	12,5 (12,7)	5,80 (6,7)	0,66	0,60	0,72	0,93	1,20
85	195,0	182,2	192,0	129,2	128,5	4,70 (2,41)	4,55 (2,50)	4,69 (2,45)	4,50 (3,48)	4,47 (3,48)	58,7 (30,1)	56,6 (31,1)	59,5 (31,0)	36,0 (28,0)	32,4 (25,2)	0,50	0,55	0,61	0,67	0,90
108	269,0	266,0	264,0	225,5	201,0	4,91 (1,83)	4,95 (1,87)	5,02 (1,91)	4,82 (2,13)	4,75 (2,36)	112,8 (42,0)	121,5 (45,7)	114,0 (43,2)	98,0 (43,5)	83,9 (41,5)	0,30	0,32	0,37	0,39	0,13
162	264,5	290,0	276,0	249,0	251,8	4,45 (1,69)	4,60 (1,59)	4,51 (1,63)	4,48 (1,79)	4,49 (1,79)	118,8 (45,0)	133,5 (46,0)	132,5 (49,0)	122,5 (49,0)	118,1 (47,0)	0,37	0,43	0,38	0,43	0,53

Tabelle 3. *Endomycopsis vernalis*
Verhältniszahlen für Eiweiß, Fett und Kohlenhydrate (KH) bei Kultur mit verschiedenen Mg-Gaben, entsprechend Tab. 2

Mg-Gabe	Alter der Kultur			
	61 Std	66 Std	85 Std	108 Std
	Eiweiß : Fett : KH	Eiweiß : Fett : KH	Eiweiß : Fett : KH	Eiweiß : Fett : KH
1/1	1 : 0,39 : 2,36	1 : 0,82 : 3,38	1 : 2,00 : 3,65	1 : 3,67 : 4,07
1/125	1 : 0,20 : 2,37	1 : 0,50 : 2,39	1 : 1,28 : 2,32	1 : 3,23 : 3,20
1/500	1 : 0,21 : 1,92	1 : 0,25 : 2,44	1 : 1,16 : 2,43	1 : 2,82 : 2,94
				Eiweiß : Fett : KH
				1 : 4,25 : 4,24
				1 : 4,37 : 3,50
				1 : 4,20 : 3,76

N-Mangel-Kulturen (1/125 und 1/500 Mg) sogar bis zur 108. Std den „Kontrollen“ (1/1 bis 1/25) überlegen. Die Fettsynthese hingegen ist in den extremen Mg-Mangelreihen sehr stark verlangsamt. In ihrem absoluten Fettgehalt bleiben sie bis zum Versuchsende hinter den Kontrollen zurück; im prozentualen Fettgehalt holen sie allmählich auf. Dies wird besonders deutlich, wenn man das Mengenverhältnis Eiweiß : Fett : Kohlenhydrate für die einzelnen Phasen des Versuches berechnet, wobei die jeweils vorhandene Eiweißmenge (Gesamt-N · 6,25) als Einheit genommen wird. Die Kohlenhydratfraktion wird dabei nach dem Vorbild mehrerer früherer Autoren (z. B. K. BERNHAUER, A. NIETHAMMER u. J. RAUCH 1948, H. A. SPOEHR und H. W. MILNER 1949) in grober Vereinfachung als Differenz Trockensubstanz — (Eiweiß + Fett) berechnet. Die auf solche Weise ermittelten Verhältniszahlen bringt Tab. 3. Es ergibt sich klar, daß in den Mg-Mangelkulturen die Fettbildung lange Zeit gegenüber der Eiweißbildung „benachteiligt“ bleibt, wenn man den Vergleich zu den reichlich mit Mg versorgten Kontrollen zieht. Erst nach 162 Std haben sich die Eiweiß/Fett-Verhältniszahlen ausgeglichen. Der Quotient Eiweiß/KH ist bei Mg-Mangel selbst beim Versuchsabschluß noch deutlich größer als bei der Kontrolle.

Unter den bisher betrachteten Kulturbedingungen läßt sich also feststellen, daß Mg-Mangel die Eiweißbildung nur schwach und kurzfristig, die Fett- (und Kohlenhydrat-)bildung hingegen stark und nachhaltig hemmt. Die Mg-Mangelzellen holen die Kontrollen in ihrem Fettgehalt erst ein, nachdem die Eiweißbildung (nach Erschöpfung der gebotenen N-Quelle) zum Abschluß gekommen ist. Weitere Aufschlüsse über die Abhängigkeit der Fett- und — insbesondere — Eiweißbildung von der Mg-Ernährung durften von Versuchen mit reichlicher N-Gabe erwartet werden.

III. Die Wirkung von Mg-Mangel bei hoher N-Gabe

Die Ergebnisse einer Versuchsreihe, in welcher der Einfluß von Mg-Mangel bei guter N-Versorgung untersucht wurde, sind in Tab. 4 wiedergegeben. Nach den früheren Erfahrungen konnte auf die Zwischenstufen der Mg-Gaben ($1/5$, $1/25$ und $1/125$ Mg) verzichtet werden. Es schien zu genügen, je eine Kulturreihe mit reichlicher Mg-Gabe ($1/1$ Mg) und mit extremem Mg-Mangel ($1/500$ Mg) zu vergleichen. Die Reihe mit $1/1$ Mg bringt keine Überraschungen. Entsprechend dem hohen N-Angebot werden eiweißreiche (bis $30,6\%$ v. Trg. Eiweiß) und fettarme (maximal $17,8\%$ v. Trg. Fett) Zellen gebildet. Nach 95—118 Std ist der Zucker- und N-Vorrat des Substrates erschöpft; die Fettreserven werden wieder abgebaut. Für einen etwa zu gleicher Zeit einsetzenden Eiweißabbau sprechen auch die Zahlen für den in den Zellen gebundenen Gesamt-N und die Tatsache, daß der p_H -Wert des Mediums langsam ansteigt: 77 Std p_H 4,6, 95 Std p_H 5,0, 118 Std p_H 5,4, 167 Std p_H 6,7 — ein Zeichen für NH_3 -Ausscheidung (vgl. H. KATING 1955a). In der Mg-Mangelkultur geht die Produktion von Zellsubstanz langsamer vor sich. Das Erntegewicht ist bei Versuchsende erst 294 mg gegenüber 422 mg bei $1/1$ Mg (nach 95 Std). Nach 214 Std in der Mg-Mangelkultur sind die Nährstoffe des Mediums noch nicht völlig verbraucht; es lassen sich in der Restnährlösung noch ca. 100 mg (von insgesamt 1500 mg) Zucker und ca. 5,2 mg (von 20,9 mg) N nachweisen. Die Hemmung der Substanzbildung bei Mg-Mangel betrifft sowohl die Eiweiß- wie die Fettfraktion der Zellen. Die Analysenzahlen lassen aber hier einen wesentlichen Unterschied erkennen. Die Prozentzahlen des N-Gehaltes sind bei den Reihen mit $1/1$ und $1/500$ Mg kaum verschieden. Dagegen bleibt der prozentuale Fettgehalt der Mg-Mangelzellen bis zur 118. Std des Versuches sehr deutlich hinter dem der Kontrollen zurück. Diese Dinge werden noch klarer, wenn man — wie es in Tab. 3 für den Versuch von Tab. 2 geschah — auch hier das Verhältnis (Eiweiß : Fett : Kohlenhydrate) für die einzelnen Phasen des Versuches berechnet (s. die letzten beiden Spalten von Tab. 4). Es zeigt sich deutlich, daß bis zur 118. Versuchsstunde die Verfettung der Mg-Mangelkulturen hinter den Kontrollen mit reichlicher Mg-Gabe zurückbleibt. Zu einem Zeitpunkt (167 Std), in welchem die $1/1$ Mg Kultur bereits ihre Fettreserven abbaut, geht die Fettbildung bei $1/500$ Mg noch weiter. Ja, sie erreicht mit einem Fett/Eiweiß-Quotienten von $0,67/1$ schließlich (214 Std) einen Wert, der höher liegt als bei den Kontrollen auf dem Höhepunkt ihrer Verfettung ($0,58/1$, 118 Std). Es ergibt sich weiter, daß in den alten $1/500$ Mg Kulturen, im Gegensatz zu den früheren Phasen des Versuches, die Fettbildung sich gegenüber der Eiweißbildung stärker durchsetzt. Daß dies kaum auf eine Erschöpfung der N-Quelle des Mediums zurückzuführen ist, lehrt die schon erwähnte Tatsache, daß noch ca. 5,2 mg N

im Substrat verfügbar wären. Worauf dieser „Dominanzwechsel“ zwischen Eiweiß- und Fettbildung zurückzuführen ist, mag zunächst unerörtert bleiben.

IV. Diskussion der Ergebnisse

Unsere Versuche haben ergeben, daß Mg-Mangel die Fettbildung bei *Endomycopsis* im allgemeinen *hemmt*. Zwar werden bei geringer Mg-Versorgung auch die Eiweißbildung und die gesamte Trockensubstanzproduktion verlangsamt, wesentlich scheint aber zu sein, daß die Fettbildung *stärker* gehemmt wird als die Eiweißbildung (vgl. die Prozentzahlen in Tab. 2 u. 4, sowie die Verhältniszahlen in Tab. 3 u. 4). Damit wird die im Schrifttum (zusammenfassend referiert bei M. STEINER, 1957, insbesondere S. 250f.) mehrfach geäußerte Auffassung neuerlich widerlegt, daß verstärkte Fettbildung bei Mikroorganismen eine Folge von Mangelernährung, eines „milieu déséquilibré“, eines „milieu impropre à la nutrition“ darstellt. Mangel eines notwendigen Nährstoffes *kann* — aus Gründen, die in jedem Einzelfall verschieden sind — zu verstärkter Fettbildung führen; Mg-Mangel hat den entgegengesetzten Effekt.

Es liegt natürlich nahe, nach einer näheren Erklärung für die durch Mg-Mangel bewirkten Verschiebungen zwischen den Hauptbahnen des Verwendungsstoffwechsels zu suchen.

Wie bereits einleitend (S. 244) bemerkt wurde, sind die Angaben der Literatur über den Einfluß der Mg-Ernährung auf die Eiweiß-, Fett- und Gesamtstoffproduktion bei Mikroorganismen spärlich und widerspruchsvoll. Zahlreich hingegen sind die Arbeiten, aus welchen die Rolle des Mg^{++} bei Einzelvorgängen vor allem des tierischen Stoffwechsels deutlich wird. Durch die Untersuchungen von H. ERDTMANN (1927, 1928a, b) und von K. LOHMANN (1931) wurde gezeigt, daß Mg-Ionen bei der alkoholischen Gärung und bei der Glykolyse im Muskel als notwendige Aktivatoren beteiligt sind. Nach A. v. EULER, R. NILSSON u. E. AUHAGEN (1931) wird der Kohlenhydratabbau, u. a. die Bildung von Hexosediphosphat, durch Mg^{++} aktiviert (s. a. G. T. CORI, S. P. COLWICK u. C. F. CORI 1938, HUSZAK 1942, S. OCHOA 1939; sowie die Arbeiten über das Cyclophorasesystem von A. L. GRAFFLIN u. D. E. GREEN 1948, W. E. KNOX, B. N. NOYCE u. V. A. AUERBACH 1948, G. H. HOGEBOM u. W. C. SCHNEIDER 1950). Auch das Fermentssystem der Fettsynthese benötigt Mg-Ionen. R. D. BRADY u. S. GURIN (1952) fanden, daß sie die Bildung von Fettsäuren in der Leber aktivieren (vgl. a. J. S. SZULMAJSTER 1954). In zellfreien Homogenaten aus Meerschweinchengehirn erfordert der maximale Einbau von ^{32}P in die Lipide u. a. die Gegenwart von Mg^{++} (R. M. C. DAWSON 1953, 1954). Schließlich bedürfen auch mehrere Fermentreaktionen des N-Stoffwechsels und speziell des Eiweißaufbaues der Mg-Ionen. Die Bildung von Diphosphopyridinnucleotid in der Schweineleber (A. KORNBERG 1950), die Glutaminsäuretransferase im Gehirn (H. WAELSCH 1951, M. SCHOU, N. GROSOWITZ, A. LAJTHA u. H. WAELSCH 1951) und das Ferment der Glutaminsäuresynthese im Gehirn von Schafen (W. H. ELLIOT 1951) werden durch Mg^{++} deutlich aktiviert. E. A. PETERSON u. D. M. GREENE (1952) schließlich konnten zeigen, daß das Fermentssystem der Leber, welches das erste Stadium der Proteinbildung durch Einbau von Aminosäuren einleitet, durch Mg-Ionen eine deutliche Förderung erfährt.

Diese Angaben der Literatur machen es verständlich, daß extremer Mg-Mangel *alle* synthetischen Prozesse in der Zelle — Gesamtproduktion der Trockensubstanz, Eiweißbildung, Fettsbildung — hemmt, wie es sich in unseren Versuchen ja in der Tat zeigte. Darüber, welche Bahn des Gesamtstoffwechsels durch Mg-Mangel zuerst und am stärksten betroffen wird, ließen sich auf Grund des bereits Bekannten keine Voraussagen machen. Zur Beantwortung dieser Frage scheinen die hier mitgeteilten Ergebnisse die ersten Anhaltspunkte zu liefern: im allgemeinen wird die Fettsbildung zuerst und am stärksten eingeschränkt, wenn sich Mg^{++} im Minimum befindet.

Es sei schließlich versucht, diese Befunde noch dem Bild einzufügen, das sich aus den bisherigen Arbeiten über den Einfluß von Mangelernährung auf die Fett- und Eiweißbildung bei *Endomycopsis vernalis* ergeben hat (s. auch M. STEINER 1957).

1. Nach den Arbeiten von M. STEINER (1938), S. HEIDE (1939) und S. RAAF (1941) verwendet der Versuchsorganismus die Abbauprodukte des Zuckers bevorzugt zur Eiweißsynthese, wenn genügend N zur Verfügung steht. Bei *N-Mangel* fließt ein immer größerer Teil des Ausgangsmaterials in die zur Fettsynthese führende Stoffwechselbahn. Bei zunehmendem N-Mangel werden immer fettreichere und eiweißärmere Zellen gebildet. Ähnlich dürfte auch die von S. HEIDE (1939) beobachtete Verstärkung der Fettsbildung bei S-Mangel zu deuten sein. Unter diesen Bedingungen können wahrscheinlich die für die Eiweißsynthese nötigen S-haltigen Aminosäuren nicht in genügendem Maße gebildet werden.

2. *K-Mangel* (M. MAAS-FÖRSTER 1955) zwingt den Pilz zu einer verminderten und weniger ökonomischen Substanzproduktion. Das Mengenverhältnis Eiweiß : Fett bleibt aber von der K-Versorgung völlig unbeeinflusst. Es kann geschlossen werden, daß K-Mangel vor allem auf dem Wege vom Kohlenhydrat bis zum gemeinsamen Ausgangsprodukt der Eiweiß- und Fettsynthese hemmend eingreift.

3. Sowohl *P-* wie *Mg-Mangel* beeinflussen das Gleichgewicht zwischen Eiweiß- und Fettsynthese, allerdings — wie in dieser Arbeit gezeigt wurde — mit umgekehrten Vorzeichen.

M. MAAS-FÖRSTER (1955) hat gezeigt, daß bereits eine Verminderung der P-Gabe auf $1/5$ der Norm (also $0,1\%$ KH_2PO_4) zu einer Verminderung der Eiweißsynthese führt. Die Fettsynthese hingegen wird gesteigert, und das gilt bis zu einer kritischen Grenzgabe von P ($1/20$ P). Der prozentuale Fettgehalt der Zellen steigt aber auch bei weiterer Verminderung der Phosphatgabe noch an. Mit zunehmendem P-Mangel kommt die Fettsynthese immer stärker in die Vorhand gegenüber der Eiweißbildung. Selbst nach Erschöpfung der C-Quelle bleibt bei P-Mangel im Medium der noch vorhandene N unbenutzt liegen. Eine Eiweißsynthese unter

Zuhilfenahme zelleigener C-Quellen findet nicht mehr (oder nur mehr in sehr geringem Umfange) statt.

Die Folgen des Mg-Mangels für den Gesamtstoffwechsel, die sich aus diesen Untersuchungen ergeben haben, brauchen hier nicht nochmals im einzelnen aufgezählt zu werden. Es sei nur hervorgehoben, daß bei Mg-Mangel zunächst die Eiweißbildung gegenüber der Synthese der übrigen Zellbestandteile (einschließlich der Fette!) im Vorteil ist; die letzteren Prozesse erscheinen deutlich gehemmt. Die Fettsynthese holt erst auf, wenn die konkurrierende Eiweißbildung zum Stillstand kommt oder sich verlangsamt. Das erstere war bei dem Versuch mit 1/4 N der Fall (Tab. 2 u. 3), wo auch in den extremen Mg-Mangelkulturen (1/500 Mg) nach 108 Std der N-Vorrat des Substrates praktisch erschöpft war. In den Versuchen mit 1/1 N (Tab. 4) zeichnet sich in der Reihe mit 1/500 Mg von der 118. Std an eine deutliche Verlangsamung der N-Assimilation ab: vorher werden 0,16—0,18 mg N, nachher 0,07 bis 0,03 mg N je Stunde assimiliert. Etwa zum gleichen Zeitpunkt beginnt hier die Fettsynthese aufzuholen.

Sowohl durch P- wie durch Mg-Mangel wird also offenbar die Konkurrenz zwischen Eiweißbildung und Fettbildung beeinflußt.

Die unter P-Mangel herangewachsenen Zellen sind in ihrem „Stoffwechseltyp“ ein für allemal festgelegt. Bei Mg-Mangel hingegen hat es den Anschein, daß die im Minimum befindlichen Mg-Ionen zunächst bevorzugt für die Eiweißsynthese in Anspruch genommen werden, später aber für andere Stoffwechselprozesse, z. B. die Fettsynthese, zur Verfügung stehen, wenn sie an der ersten Stelle nicht mehr gebraucht werden. Mit diesem Deutungsversuch steht die Tatsache in gutem Einklang, daß Mg^{++} in der Hauptsache als Aktivator bei enzymatischen Prozessen dient, im Gegensatz zu PO_4 aber kaum in bestimmten organischen Zellbestandteilen festgelegt wird.

Auch in den Versuchen von R. RAVEUX (1954) mit *Aspergillus niger* finden sich ähnliche Verhältnisse angedeutet. Wurde der Mg-Gehalt der (4fach konzentrierten) CZAPEK-Lösung von 4/1 auf 4/20 und weiter auf 4/50 erniedrigt, so verminderte sich die Pilztrockensubstanz von 5390 auf 3160 und 2436 mg. Der (aus der Tabelle des Verf. errechnete) prozentuale Gehalt am Gesamteiweiß lag bei 20,2; 30,0; 34,0%, der Gehalt an acetonlöslichen Lipoiden bei 4,9; 3,9; 3,8%. Von einem ausgesprochenen Mg-Mangel kann bei diesen Versuchen wahrscheinlich noch gar nicht gesprochen werden. Immerhin fällt auf, daß sich abnehmende Mg-Gabe in einer Verminderung des prozentualen Fettanteiles auswirkt. Für die Gesamtlipoide (acetonlösliche und -unlösliche Fraktion) liegen die Prozentwerte allerdings in der umgekehrten Reihenfolge: 7,9; 8,1; 8,5%, wenn diese kleinen Unterschiede überhaupt als reell betrachtet werden dürfen.

Zusammenfassung

1. Wirkungen von Mg-Mangel auf den Verwendungsstoffwechsel von *Endomycopsis vernalis* sind erst bei Mg-Gaben von 2,0 γ /ml oder darunter festzustellen.

2. In Mg-Mangelzellen sind alle Stoffwechselprozesse verlangsamt, was vor allem in einer verzögerten Trockensubstanzproduktion zum Ausdruck kommt.

Die bei Mg-Mangel heranwachsenden Zellen sind zunächst immer eiweißreicher und fettärmer als die genügend mit Mg versorgten Kontrollen.

Erst wenn die Eiweißsynthese aufhört oder abklingt, setzt auch in Mg-Mangelzellen eine verstärkte Fettsynthese ein.

3. Es wird eine zusammenfassende Übersicht über die Wirkungen des Mangels an den verschiedenen Nährstoffen auf die Eiweiß- und Fettsynthese des Versuchsorganismus gegeben.

4. Die bei Mg^{++} -Mangel festgestellten Erscheinungen lassen sich durch die Annahme einer Konkurrenz um die Mg-Ionen erklären.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe, Frl. KATRIN AXT für ihre Hilfe bei der experimentellen Arbeit.

Literatur

- BERNHAEUER, K., A. NIETHAMMER u. J. RAUCH: *Biochem. Z.* **369**, 77 (1948). —
 BRADY, R. D., S. GURIN und J. VAN BAALEN: *J. biol. Chem.* **199**, 421 (1952).
 CORI, G. T., S. P. COLOWICK und C. F. CORI: *J. biol. Chem.* **123**, 375 (1938).
 DAWSON, R. M. C.: *Biochem. J.* **55**, 507 (1933); **57**, 237 (1954).
 ELLIOT, W. H.: *Biochem. J.* **49**, 106 (1951). — ERDTMANN, H.: *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **172**, 182 (1927); **177**, 211 (1928a); 231 (1928b). — EULER, A. v.: R. NILSSON u. E. AUHAGEN: *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **200**, 1 (1931).
 GARRIDO, J. M., M. WOODBINE und TH. WALKER: *An. Real. Soc. Españ. Fisic y Quim.*, Ser. B **49**, 829 (1953). — GRAFFLIN, A. L., and D. E. GREEN: *J. biol. Chem.* **176**, 95 (1948).
 HEIDE, S.: *Arch. Mikrobiol.* **10**, 135 (1939). — HOGEBOOM, G. H., and W. C. SCHNEIDER: *J. biol. Chem.* **186**, 417 (1950). — HUSZAK, J.: *Biochem. Z.* **312**, 315 (1942).
 KATING, H.: *Arch. Mikrobiol.* **22**, 368 (1955). — KLEINZELLER, A.: *Biochem. J.* **38**, 480 (1944). — KNOX, W. E., B. N. NOYCE und V. H. AUERBACH: *J. biol. Chem.* **176**, 117 (1948). — KORNBERG, A.: *J. biol. Chem.* **182**, 772 (1950).
 LOCKWOOD, L. B., G. E. WARD, O. F. MAY, H. T. HERRICK u. H. T. O'NEILL: *Zbl. Bakt.*, II. Abt. **90**, 411 (1934). — LOHMANN, K.: *Naturwissenschaften* **19**, 180 (1931a); *Biochem. Z.* **237**, 445 (1931b).
 MAAS-FÖRSTER, M.: *Arch. Mikrobiol.* **22**, 115 (1955). — MACLEOD, L. D. and J. SMEDLEY-MACLEAN: *Biochem. J.* **32**, 1571 (1938). — MANCEAU, P.: *C. R. Soc. Biol. (France)* **106**, 1036 (1931).
 OCHOA, S.: *Nature (Lond.)* **144**, 834 (1939).
 PETERSON, E. A. and D. M. GREENBERG: *J. biol. Chem.* **194**, 359 (1952).
 RAAF, H.: *Arch. Mikrobiol.* **12**, 131 (1941). — RAVEUX, R.: *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **238**, 1254 (1954).
 SCHOU, N., N. GROSSOWITZ, A. LAJTHA und H. WAELSCH: *Nature (Lond.)* **167**, 818 (1951).
 SPOEHR, H. A. and H. W. MILNER: *Plant. Physiol.* **24**, 120 (1949). — STEINER, M.: *Ber. dtsch. bot. Ges.* **56**, 73 (1938); *Handb. d. Pflanzenphysiol.* Bd. VII, 209, (1957). Berlin, Göttingen, Heidelberg. — SZULMAJSTER, J. S.: *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **238**, 2461 (1954).
 WAELSCH, H.: *Fed. Proc.* **10**, 266 (1951).

(Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn)

Beobachtungen über das Verhalten von *Azotobacter* im Wurzelbereich höherer Pflanzen

Von

B. STILLE *

(Eingegangen am 5. Mai 1958)

Das umfangreiche Schrifttum über die Mikroflora der Rhizosphäre¹ enthält zahlreiche Mitteilungen über das Vorkommen und Verhalten von *Azotobacter* im engeren Wurzelbereich höherer Pflanzen. Besonders häufig wurde die zahlenmäßige Dichte von *Azotobacter* innerhalb der Rhizosphäre untersucht, in der Annahme, aus dem kulturell nachweisbaren *Azotobacter*-Gehalt auf eine entsprechende Förderung des Pflanzenwachstums schließen zu können. Die bisherigen Befunde sind jedoch außerordentlich uneinheitlich, da sie durch die verschiedenartigsten natürlichen Faktoren (Pflanzenart, Entwicklungszustand, Bodentyp, Antagonisten, klimatische Verhältnisse, Jahreszeit usw.) bedingt sind.

Im folgenden seien Teilergebnisse aus einer breiteren Untersuchung über das ökologische Verhalten von *Azotobacter* im Wurzelbereich von Kulturpflanzen wiedergegeben, da sich aus ihnen — trotz der Vielschichtigkeit der natürlichen Verhältnisse — einige allgemeinere Schlußfolgerungen ableiten lassen.

Zum Nachweis des *Azotobacter*-Gehaltes wurden die Pflanzen mit den Wurzelballen ausgegraben, die intakten Wurzeln schonend freigelegt und von der ihnen direkt anhaftenden Erde jeweils 5 Einzelproben von je 2—5 g in sterile Petrischalen übertragen. Stets wurden zum Vergleich Bodenproben aus dem benachbarten undurchwurzelten Bereich aus einer Tiefe von 5—10 cm entnommen. Dann wurde von den gründlich durchmischten Proben je 1 g in 100 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, um davon nach ausgiebigem Schütteln in den Verdünnungsstufen 1:100 und 1:1000 Agarplatten (je 5 Parallelen) anzulegen. Als N-freier Nährboden diente Mannit-Agar nach ASHBY (Zusammensetzung: Aqua dest. 1000,0, Mannit 15,0, KH_2PO_4 0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2, NaCl 0,2, $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1, CaCO_3 5,0, Agar 15,0 g). Die Bruttemperatur betrug 30° C.

* Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. h. c. RIPPEL-BALDES, zum 70. Geburtstag.

¹ Neuere zusammenfassende Literatur bei KATZNELSON, LOCHHEAD und TIMONIN (1948), CLARK (1949), WAKSMAN (1952) und RIPPEL-BALDES (1955).

Azotobacterdichte in der Rhizosphäre von Kulturpflanzen und im angrenzenden wurzelfreien Boden bei verschiedenen Bodentypen

Aus den Versuchsreihen ergibt sich, daß sämtliche untersuchten landwirtschaftlichen Nutzpflanzen während ihrer fröhsommerlichen Haupt-

Versuchsreihe I: Freiland, Versuchsfeld Bonn-Poppelsdorf (Braunerde hoher Basensättigung; feinsandiger Lehm), Probenahmen in der 2. Junihälfte

Pflanzenart	Azotobacter-Dichte je Gramm		R : S
	Rhizosphäre R	undurchwurzelter Boden S	
<i>Triticum vulgare</i>	10300	4900	2,1
<i>Secale cereale</i>	6600	3900	1,7
<i>Hordeum sativum</i>	4100	3800	1,1
<i>Avena sativa</i>	8700	6200	1,4
<i>Zea mays</i>	9300	3500	2,6
<i>Solanum tuberosum</i>	8700	4800	1,8
<i>Solanum lycopersicum</i>	3300	1700	1,9
<i>Nicotiana tabacum</i>	5400	3500	1,4
<i>Pisum sativum</i>	12700	5800	2,2
<i>Phaseolus vulgaris</i>	6400	8000	0,8
<i>Vicia faba</i>	18600	5800	3,2
<i>Medicago sativa</i>	5600	3100	1,8
<i>Trifolium pratense</i>	7400	4900	1,5
<i>Beta vulgaris</i>	3200	3600	0,9
<i>Spinacia oleracea</i>	14300	6200	2,3
<i>Linum usitatissimum</i>	8300	7000	1,2
<i>Cucurbita pepo</i>	2700	4500	0,6
<i>Cucumis sativus</i>	4600	3300	1,4
<i>Raphanus sativus</i>	9300	5200	1,8
<i>Brassica napus</i>	2100	3000	0,7
<i>Brassica oleracea</i>			
<i>var. sabauda</i>	3200	5300	0,6
<i>var. capitata</i>	18900	5700	3,3
<i>var. acephala</i>	9200	7100	1,3
<i>var. botrytis</i>	5400	4900	1,1
<i>var. gemmifera</i>	2800	3400	0,8
<i>Daucus carota</i>	9600	2800	3,4
<i>Lactuca sativa</i>	7400	6500	1,1
<i>Allium cepa</i>	3200	3400	0,9
<i>Allium schoenoprasum</i>	4100	5100	0,8
<i>Petroselinum sativum</i>	14000	4600	3,1
			$M = 1,62$

wachstumsphase in *Azotobacter*-haltigen Böden innerhalb ihres engeren Wurzelbereiches ebenfalls einen erheblichen *Azotobacter*-Gehalt aufweisen. Eine Verdrängung von *Azotobacter* aus der Rhizosphäre — wie sie

BUKATSCH u. HEITZER sowie METZ bei verschiedenen Wildpflanzen (*Chelidonium maius*, *Crepis virens*, *Hieracium pilosella*, *Hypericum perforatum*,

Versuchsreihe II: Mitscherlich-Gefäße, Erde vom Versuchsfeld (wie Reihe I) mit 10% humusreicher Komposterde gemischt, Probenahmen in der 2. Junihälfte

Pflanzenart	Azotobacter-Dichte je Gramm		R : S
	Rhizosphäre R	undurchwurzelter Boden S	
<i>Triticum vulgare</i>	10600	3800	2,6
<i>Secale cereale</i>	5200	4800	1,1
<i>Hordeum sativum</i>	4800	3600	1,3
<i>Avena sativa</i>	11600	6600	1,8
<i>Zea mays</i>	6100	5400	1,1
<i>Solanum lycopersicum</i>	5500	7400	0,7
<i>Pisum sativum</i>	3800	5800	0,7
<i>Phaseolus vulgaris</i>	5200	3400	1,5
<i>Beta vulgaris</i>	7300	6100	1,2
<i>Linum usitatissimum</i>	8400	5200	1,6
<i>Daucus carota</i>	8700	4600	1,9
<i>Petroselinum sativum</i>	7000	6200	1,1
			$M = 1,38$

Versuchsreihe III: Mitscherlich-Gefäße, sehr schwach entwickelte Braunerde geringer Basensättigung aus silikathaltigem feinen Dünen sand (Tannenbusch bei Bonn), kaum anlehmig; zusätzliche Mineraldüngung je Topf 2 l Nährlösung nach VAN DER CRONE. Probenahmen in der 2. Junihälfte

Pflanzenart	R	S	R : S
<i>Triticum vulgare</i>	8800	620	14,1
<i>Secale cereale</i>	6800	440	15,4
<i>Hordeum sativum</i>	7200	280	25,7
<i>Avena sativa</i>	5600	400	14,0
<i>Zea mays</i>	7400	860	8,6
<i>Solanum lycopersicum</i>	8000	460	17,4
<i>Pisum sativum</i>	8400	820	10,2
<i>Phaseolus vulgaris</i>	6000	580	10,3
<i>Beta vulgaris</i>	4900	940	5,2
<i>Linum usitatissimum</i>	6200	510	12,2
<i>Daucus carota</i>	4800	700	6,8
<i>Petroselinum sativum</i>	7100	760	9,3
			$M = 12,4$

Ranunculus acer u. a.) durch *Azotobacter*-hemmende Wurzelausscheidungen feststellen konnten — ließ sich bei ihnen auch nicht andeutungsweise beobachten.

Hinsichtlich der *Azotobacter*-Dichte innerhalb und außerhalb der Rhizosphäre lassen die Ergebnisse der Versuchsreihen I und II einerseits und der Versuchsreihe III andererseits einen deutlichen Unterschied erkennen:

In den ausgeglichenen nährstoffreichen Böden (I und II) stimmt der *Azotobacter*-Gehalt innerhalb und außerhalb der Rhizosphäre in verhältnismäßig engen Grenzen überein. Für die verschiedenen Bestimmungen der Versuchsreihe I läßt sich im Mittelwert ein $\frac{R}{S}$ -Verhältnis¹ von 1,62 (bei Einzelwerten zwischen 0,6 und 3,4) und für die Versuchsreihe II ein $\frac{R}{S}$ -Verhältnis von 1,38 (bei Einzelwerten zwischen 0,7 und 2,6) errechnen. Dagegen zeigt sich in der Versuchsreihe III (kaum anlehmiger Dünen sand, außerordentlich arm an organischen Substanzen, mit zusätzlicher Minereraldüngung) stets eine beträchtliche Zunahme der *Azotobacter*-Dichte innerhalb der Rhizosphäre gegenüber dem wurzelfreien Boden; hier ergibt sich im Mittelwert ein $\frac{R}{S}$ -Verhältnis von 12,4 (bei Einzelwerten zwischen 5,2 und 25,7).

Die geringe *Azotobacter*-Dichte in dem sandigen Boden ist zweifellos durch dessen Mangel an organischen Substanzen bedingt; der deutliche Anstieg innerhalb der Rhizosphäre dürfte vorwiegend auf organische Stoffausscheidungen der Pflanzenwurzeln und auf Substanzen, die beim Zerfall absterbender Wurzelteile verfügbar werden, zurückzuführen sein.

Die obigen Tabellen vermitteln zwar eine Übersicht über die zahlenmäßige Verbreitung von *Azotobacter* innerhalb und außerhalb der Rhizosphäre der Versuchspflanzen bei sehr verschiedenartigen Bodentypen; sie ermöglichen jedoch keineswegs einen Einblick in die physiologische Leistung, die von den *Azotobacter*-Zellen in den verschiedenen Bodenräumen vollzogen wird. Infolgedessen wäre es durchaus abwegig, lediglich aus der kulturell nachgewiesenen *Azotobacter*-Dichte von Fall zu Fall auf eine entsprechende Förderung der höheren Pflanze zu schließen. Die physiologische Aktivität, insbesondere das Ausmaß der Stickstoffbindung von *Azotobacter*, wird durch zahlreiche Faktoren bedingt, so daß die N-Gewinne in den verschiedenen Lebensräumen auch bei gleicher Zellenzahl erheblich voneinander abweichen können.

Der von *Azotobacter* gebundene Luftstickstoff wird im wesentlichen zunächst in körpereigenem Eiweiß festgelegt, so daß er erst beim Zerfall abgestorbener *Azotobacter*-Zellen für die übrigen Bodenmikroben und für die höheren Pflanzen verfügbar wird. Je größer nun der Umsatz an *Azotobacter*-Zellen ist, desto höher sind die N-Gewinne, die dann direkt oder indirekt auch den höheren Pflanzen zufließen. Ein vorzeitiges Absterben

¹ Das $\frac{R}{S}$ -Verhältnis kennzeichnet die relative *Azotobacter*-dichte innerhalb der Rhizosphäre (R) im Vergleich zum benachbarten undurchwurzelten Boden (Soil) (S).

der *Azotobacter*-Zellen setzt jedoch besondere äußere Einwirkungen voraus, und in dieser Hinsicht dürften vor allem Antagonisten eine wichtige Rolle spielen.

Die gesamte Bakteriendichte nimmt im pflanzlichen Wurzelbereich im Vergleich zum freien Boden im allgemeinen wesentlich stärker als der *Azotobacter*-Gehalt zu. So konnten STARKEY und andere Autoren innerhalb der Rhizosphäre zahlreicher Pflanzen Zunahmen des Gesamtkeimgehaltes um das 100—200fache feststellen. Auch hinsichtlich des Vorkommens bestimmter Bakterienarten ließen sich erhebliche Verschiebungen nachweisen. Sporenbildende Arten treten innerhalb der Rhizosphäre zahlenmäßig meist deutlich zurück, während verschiedene gram-negative nichtsporenbildende Arten mit besonderen Nährstoffsprüchen, vor allem bezüglich ihrer Versorgung mit organisch gebundenem Stickstoff, sich dort außerordentlich stark anreichern. Unter den zahlreichen Eiweißzersetzern findet sich nach CLARK u. STARC ein hoher Anteil an Fluoreszenten, insbesondere der Gattungen *Pseudomonas* und *Xanthomonas*; vor allem *Pseudomonas fluorescens* soll sich gelegentlich im engeren Wurzelbereich so stark anreichern können, daß dadurch *Azotobacter* aus der näheren Umgebung geradezu verdrängt werden kann. Nun deutet jedoch vieles darauf hin, daß es sich bei diesem Vorgang keineswegs um eine einfache Verdrängung handelt, sondern daß dort ein parasitäres Geschehen in kleinsten Räumen vorliegt, indem *Pseudomonas fluorescens* bei starker Massenentwicklung durch seine Toxine laufend *Azotobacter*-Zellen zum Absterben bringt und deren Körpereiweiß als ergiebige Nahrungsquelle verwertet.

Die folgende Versuchsreihe, die sich in methodischer Hinsicht an eine frühere Untersuchung (STILLE 1938) anlehnt, gibt eine Sterilsynthese von Weizen mit Reinkulturen von *Azotobacter chroococcum* und *Pseudomonas fluorescens* wieder.

Eine Anzahl großer Reagensgläser (Inhalt 100 ml) wurde mit je 30 g gewaschenem Feinsand beschickt und im Trockenschrank sterilisiert. Dann wurden in jedes Glas sterile Nährlösung nach VAN DER CRONE bis zur Sättigung des Sandes einpipettiert und je 3 — zuvor in 1% iger Bromlösung sterilisierte — Weizenkaryopsen eingebracht. Keimung und weiteres Wachstum erfolgten in einer Gewächshauskabine bei ausreichender Lichtzufuhr und Temperaturen zwischen 16 und 22° C. Gelegentliche Wasserverluste während der Versuchsdauer wurden durch Zugabe von sterilem Wasser ausgeglichen. 5 Tage nach dem Ansatz wurde der Inhalt sämtlicher Gläser durch Abimpfungen auf Nährböden auf Sterilität geprüft, und in jene Gläser, die sich als steril erwiesen, wurde am 7. Tage je 2 ml einer sehr verdünnten Aufschwemmung von *Azotobacter chroococcum* (Dichte je ml 560 Zellen) einpipettiert. Am 14. Tage wurde die Serie geteilt und bei der einen Hälfte je Glas 5 Tropfen einer schwachen Aufschwemmung von *Pseudomonas fluorescens* (Keimdichte je ml 1200, somit je Tropfen etwa 50—60 Zellen) zugesetzt. Am 17. Tage erfolgten die Keimzahlbestimmungen (für *Azotobacter* auf Ashby-Nähragar, für *Ps. fluorescens* auf Bouillon-Glycerin-Agar), die je 1 g Sandprobe aus dem engeren Wurzelbereich folgende Werte ergaben:

Reihe A. Weizen, steril gekeimt, am 7. Tage mit *Azotobacter* beimpft. *Azotobacter*-Dichte am 17. Tage (je Gramm Sandboden aus dem Wurzelbereich):

Glas 1	154 000
Glas 2	276 000
Glas 3	98 000
Glas 4	131 000
Glas 5	210 000
$M =$	174 000

Reihe B. Weizen, steril gekeimt, am 7. Tage mit *Azotobacter chroococcum* und am 14. Tage zusätzlich mit *Pseudomonas fluorescens* beimpft. Keimzahlbestimmungen am 17. Tage (je Gramm Sandboden aus dem Wurzelbereich):

	<i>Azotobacter</i>	<i>Pseudom. fluorescens</i>
Glas 6	6200	310 000
Glas 7	2800	244 000
Glas 8	9300	510 000
Glas 9	5500	186 000
Glas 10	12 600	340 000
$M =$	7300	$M =$ 318 000

Die Zahlen der Versuchsreihe A lassen die starke Entwicklung von *Azotobacter* in ungestörter Sterilsynthese mit Weizen erkennen. Da der ausgewaschene Sand ursprünglich keine organischen Substanzen enthielt, muß der beträchtliche Anstieg des *Azotobacter*-Gehaltes ausschließlich auf organische Stoffausscheidungen der Pflanzenwurzeln bzw. auf Zerfallsprodukte abgestorbener Wurzelteile zurückzuführen sein.

In der Versuchsreihe B konnte die Entwicklung von *Azotobacter* bis zum 14. Tage in der gleichen Weise wie in der Reihe A verlaufen. Für die dann einsetzende rapide Vermehrung von *Pseudomonas fluorescens* kommen im wesentlichen folgende Nahrungsquellen in Betracht:

1. von *Azotobacter* nicht verwertete bzw. nicht angreifbare Wurzelausscheidungen und pflanzliche Zellreste,
2. durch Toxine von *Pseudomonas fluorescens* bereits vorzeitig außer Funktion gesetzte Wurzelhaare (STILLE 1956), die dann saprophytisch verwertet werden,
3. die Körpersubstanzen der durch Toxine von *Pseudomonas fluorescens* getöteten *Azotobacter*-Zellen.

In dem vorliegenden Fall trat nach dem Einimpfen von *Pseudomonas fluorescens* in kürzester Zeit eine sehr starke Abnahme der *Azotobacter*-Dichte ein (die 3 Tage nach dem Einimpfen von *Ps. fluorescens* in den Serien A und B für *Azotobacter* ermittelten Keimzahlen verhalten sich wie 25 : 1), und zweifellos dürften vorwiegend die getöteten *Azotobacter*-Zellen in dem nährstoffarmen Substrat das Ausgangsmaterial für die spontane Massenentwicklung von *Pseudomonas fluorescens* geliefert haben.

Im Freiland bestimmen unter den vielschichtigen natürlichen Bedingungen zahlreiche mit-, gegen- und nacheinander wirkende Faktoren das mikrobiologische Geschehen; es ist daher einleuchtend, daß aus den Ergebnissen von Sterilsynthesen sich nur mit größter Zurückhaltung Schlußfolgerungen auf die unter natürlichen Verhältnissen ablaufenden mikrobiologischen Vorgänge ableiten lassen. In methodischer Hinsicht bieten Sterilsynthesen jedoch den besonderen Vorzug, bestimmte Abläufe unter Ausschaltung heterogener Nebenwirkungen zu erfassen. Das obige Beispiel zeigt, daß innerhalb der pflanzlichen Rhizosphäre ein sehr lebhafter Umsatz von *Azotobacter*-Zellen erfolgen kann und dort mit entsprechend höheren Stickstoffgewinnen zu rechnen ist als im undurchwurzelten Boden, wo die Lebensdauer der *Azotobacter*-Zellen weniger durch Antagonisten begrenzt wird.

Zusammenfassung

Es wurde der *Azotobacter*-Gehalt innerhalb der Rhizosphäre zahlreicher landwirtschaftlicher Nutzpflanzen während ihrer frühlommerlichen Wachstumsphase untersucht. Die Zunahmen gegenüber dem wurzelfreien Boden bewegen sich im allgemeinen in sehr engen Grenzen, können jedoch erheblich sein, falls der Boden arm an organischen Stoffen ist. Eine Verdrängung von *Azotobacter* durch Wurzelausscheidungen ließ sich bei den Versuchspflanzen nicht feststellen. N-Gewinne ergeben sich nicht so sehr aus der *Azotobacter*-Dichte als vielmehr aus dem laufenden Umsatz an *Azotobacter*-Zellen; an diesem Geschehen dürften Antagonisten, insbesondere Fluoreszenten, die sich im Wurzelbereich stark anreichern können, wesentlich beteiligt sein. In Sterilsynthesen (Weizen und *Azotobacter*) ließ sich bei nachträglicher Beimpfung mit *Pseudomonas fluorescens* ein spontaner Abbau von *Azotobacter*-Zellen und deren Verwertung als Nahrungsquelle nachweisen.

Ausgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Literatur

- BUKATSCH, FR., u. J. HEITZER: Arch. Mikrobiol. **17**, 79—96 (1952).
CLARK, F. E.: Trans. Kansas Acad. Sci. **43**, 75—84 (1940). — Adv. Agronomy **1**, 241—288 (1949).
KATZNELSON, H., A. G. LOCHHEAD and N. I. TIMONIN: Bot. Review **14**, 543—586 (1948).
METZ, H.: Arch. Mikrobiol. **23**, 297—326 (1955/56).
RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie, 3. Aufl. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955.
STARCK, A.: Arch. Mikrobiol. **13**, 164—181 (1943). — STARKEY, R. L.: Soil Sci. **32**, 367—393 (1931). — STILLE, B.: Arch. Mikrobiol. **9**, 477—485 (1938); **26**, 71—82 (1957).
WAKSMAN, S. A.: Soil Microbiology, New York (1952).

(Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Bakteriologie, Berlin-Dahlem)

Über die spontane Mutation von Phagenresistenz nach Phagensensibilität*

Von
H. STOLP

Mit 6 Abbildungen im Text

(Eingegangen am 22. Februar 1958)

Die Infektion einer Bakterienzelle mit einer virulenten Phagenpartikel führt unter geeigneten Kulturbedingungen zur Lysis der Zelle und Entstehung von Tochterphagen. Wird eine große Anzahl von Bakterien einer sensiblen Kultur der Wirkung virulenter Phagen ausgesetzt, dann ist häufig zu beobachten, daß die überwiegende Mehrzahl der Zellen lysiert, daß aber einige wenige zur Vermehrung kommen. In Flüssigkeitskultur folgt nach einem zunächst einsetzenden Rückgang in der optischen Dichte ein erneuter Anstieg; auf festem Nährboden ist nach konfluieren der Lysis die Entwicklung einzelner Kolonien zu erkennen. Kulturen, die von solchen Kolonien angelegt werden, besitzen erblich fixierte Resistenz gegenüber den für die Elternbakterien aktiven Phagen. Die Frage, ob es sich bei den phagenresistenten Typen um Mutanten der sensiblen Bakterien handelt, die spontan und unabhängig von den eingesetzten Phagen entstanden sind, oder ob sich die erblichen Änderungen erst unter dem Einfluß der Phagen an den überlebenden Bakterien vollziehen, wurde von LURIA u. DELBRÜCK (1943) im Sinne der ersten Annahme entschieden. Sie konnten zeigen, daß es sich bei den phagenresistenten Typen um spontan entstandene Mutanten handelt, die nach der Lysis der überwiegenden Mehrzahl der Zellen aus einem Populationsgemisch herausselektioniert werden. Später bestätigten J. u. E. LEDERBERG (1952) mit der von ihnen entwickelten Replikatechnik das von Phagen unabhängige Auftreten phagenresistenter Bakterienmutanten. Da die Ermittlung der Anzahl resistenter Mutanten in einer Kultur sensibler Bakterien infolge der Eigenvermehrung keine Aussagen über die Häufigkeit des Mutationsereignisses zuläßt, haben LURIA u. DELBRÜCK (1943) experimentelle und mathematische Methoden entwickelt, die eine Bestimmung der Mutationsrate (definiert als die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Bakterium zwischen zwei Zellteilungen mutiert) ermöglichen. Es handelt sich

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag gewidmet.

um Methoden, die entweder von der Anzahl der keine Mutanten enthaltenden Subkulturen einer gemeinsamen Ausgangskultur oder von der Durchschnittszahl der resistenten Bakterien pro Kultur ausgehen. Die für *T1* und *B. coli* B errechneten Resistenzmutationsraten lagen mit der Größenordnung von 10^{-7} bis 10^{-8} pro Bakterienzellteilung im Bereich der allgemein bei Mikroorganismen zu beobachtenden Mutationsraten. Das bedeutet, daß in etwa 10^8 Bakterien (1 Kolonie) alle genetischen Typen, die durch einen Mutationsschritt zu erreichen sind, auftreten und für eine Selektionswirkung verfügbar werden können. Solange die Mutanten im Vergleich zu den übrigen Individuen der Kultur keinen selektiven Vorteil besitzen, erscheint die Kultur einheitlich. Das Anlegen bestimmter Selektionsfaktoren, wie z. B. spezifisch wirkender Phagen, läßt den heterogenen Charakter einer Bakterienpopulation jedoch deutlich in Erscheinung treten.

Über die spontane wie induzierte Mutation von Phagensensibilität → Phagenresistenz liegen zahlreiche Untersuchungen vor (BEALE 1948, BRYSON u. DAVIDSON 1951, DELBRÜCK 1948, DEMEREC u. FANO 1945, GEZELOIUS u. FRIES 1952, GRAHAM u. NELSON 1953, KAPLAN 1950, KLECZKOWSKA 1950, J. u. E. LEDERBERG 1952, LURIA u. DELBRÜCK 1943, NEWCOMBE 1948, SCHOLTENS 1936). Daß auch die spontane Reversion von Resistenz → Sensibilität vorkommt, ist nach dem, was über Mutation und Rückmutation bekannt ist, zu erwarten. Eine quantitative Analyse dieses Mutationsschrittes ist jedoch mit den für die Erforschung der Resistenzmutation entwickelten Techniken nicht möglich. Man kann wohl in Gegenwart eines Antibioticums oder eines Phagen aus einer sensiblen Kultur resistente Mutanten isolieren; auch ist es technisch möglich, z. B. Mutationen nach Streptomycin-Unabhängigkeit in Str.-abhängigen Bakterienpopulationen (als besonderer Form der Resistenz) zu erfassen (LABRUM 1953). Für die Isolierung sensibler Mutanten aus einer Population resistenter Bakterien läßt sich aber kein bestimmter Selektionsfaktor einsetzen. Bei einer phagenresistenten Kultur von *Bac. megaterium* war es nun infolge einer engen Kopplung von Phagensensibilität und Koloniecharakter möglich, quantitative Untersuchungen über diesen m. W. bislang nicht untersuchten Mutationsschritt durchzuführen. Über das Ergebnis wird im folgenden berichtet.

Material und Methoden

1. Bakterien und Phagen

Aus der lysogenen Kultur *Bac. megaterium* 899 (H^+)_o war der sporogene Stamm *M 30* als De-Lysogenante (Verlust des Prophagen) isoliert worden (STOLP 1957). *M 30* verhält sich sensibel für den homologen Phagen der Elternbakterien und ist außerdem sensibel für eine virulente Mutante *C 1* (bildet Plaques auf *M 30*, besitzt aber keine Lysogenisationsfähigkeit) und für eine supervirulente Mutante *C 2*

(bildet Plaques auf *M 30* und der lysogenen Ausgangskultur). *C 1* und *C 2* sind als Mutanten des homologen Phagen H^+ isoliert worden.

M 30 bildet Kolonien vom Rauhtyp (Abb. 1, kleine Kolonien). Unter der Einwirkung von *C 1*-Phagen wurden *M 30/C 1*-Stämme isoliert, die sowohl vom Rauhtyp (*R*-Form) als auch vom Glatt-Typ (*S*-Form) waren. Der für die Untersuchungen eingesetzte Stamm *M 30/C 1 Gl* bildet große, stark schleimig-wäßrige Kolonien (Abb. 1, die beiden großen Kolonien). Die Vermehrungsgeschwindigkeit von *M 30/C 1 Gl* ist beträchtlich größer als die von *M 30*. Abb. 1 zeigt die Entwicklung

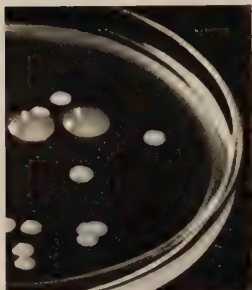


Abb. 1

Abb. 1. *M 30* (kleine) und *M 30/C 1 Gl* (große Kolonien), als Sporengemisch aufgesprüht, Entwicklung 24 Std bei 37° C

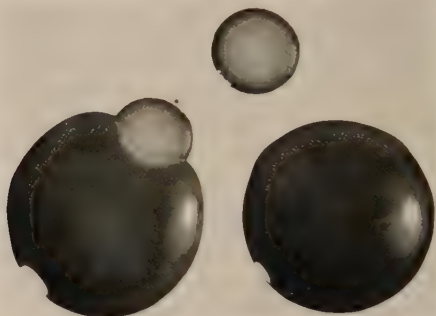


Abb. 2

Abb. 2. Größen- und Strukturunterschiede bei gleichalten *M 30*- und *M 30/C 1 Gl*-Kolonien (wie Abb. 1)

im Gemisch gleichzeitig aufgesprühter Sporen von *M 30* und *M 30/C 1 Gl* nach 24 Std. In Abb. 2 wird der Unterschied in der Größe und in der Oberflächenbeschaffenheit gleichalter Kolonien noch deutlicher.

2. Erkennen der Mutanten

Wenn eine Einzelkolonie von *M 30/C 1 Gl* auf Schrägröhrchen überimpft und die sich entwickelnde Kultur über einige Passagen vermehrt wird, dann ist zu beobachten, daß der Stamm immer mehr seinen Glatt-Typ-Charakter verliert und daß die nach der Populationsverschiebung schließlich auftretende Rauhförm wieder für *C 1*-Phagen sensibel ist. Trotz größerer Vermehrungsgeschwindigkeit von *M 30/C 1 Gl* setzen sich die Mutanten des Rauhtyps (im folgenden als *M 30/C 1 sR* bezeichnet: *s* = sensibel; *R* = Rauhtyp) durch und verändern so den Kulturcharakter. Die Ursache dafür liegt in der Fähigkeit der *M 30/C 1 sR*-Mutanten, sich nach Beendigung des Wachstums der *M 30/C 1 Gl*-Bakterien noch weiter zu vermehren und dadurch das Verhältnis von *M 30/C 1 Gl*:*M 30/C 1 sR* bei jeder weiteren Überimpfung zu Gunsten von *M 30/C 1 sR* zu verschieben. Läßt man einzelne Glatt-Kolonien (Abb. 1) nach Abschluß ihrer maximalen Entwicklung 2–3 Tage altern, dann sinkt die zuvor konvex erhobene, schleimige und hyaline Koloniemasse in sich zusammen, und es tritt die Entwicklung von Sekundärkolonien des Rauhtyps in Erscheinung (Abb. 3). Ihre Anzahl entspricht den während der Kolonienentwicklung erfolgten Mutationsschritten von Glatt → Rauh. Nachdem durch die Isolierung zahlreicher Sekundärkolonien sichergestellt war, daß es sich hierbei um für *C 1* sensibel gewordene Mutanten handelt, konnte die Mutation von Glatt → Rauh mit der von Resistenz → Sensibilität gleichgesetzt werden. Die Richtigkeit dieser Feststellung läßt sich durch folgenden Versuch demonstrieren: Auf eine dicht beimpfte

Platte (*M 30/C 1 Gl*-Sporen) wird ein Tropfen konzentrierter *C 1*-Lösung aufgesetzt. Nach etwa 2 Tagen werden die in dem *M 30/C 1 Gl*-Rasen sich entwickelnden Sekundärkolonien außerhalb der Phagenzone deutlich erkennbar (Abb. 4). Im Bereich der Phagenwirkung selbst bleibt ihre Entwicklung aus, oder einige in der Tiefe der Agarschicht (Doppelschichtmethode) zur Entwicklung gekommene Bakterienkolonien werden lysiert und erscheinen als helle Punkte (siehe auch lysierte Kolonien in der Randzone!). Der Grundrasen der resistenten *M 30/C 1 Gl*-Bakterien bleibt demgegenüber unbeeinflusst. Die schwache Aufhellung im Bereich

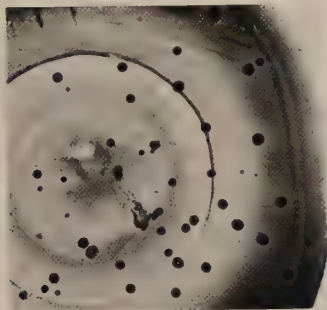


Abb. 3

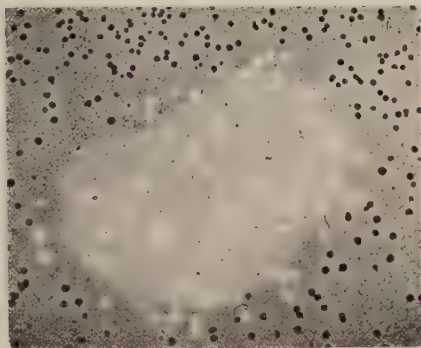


Abb. 4

Abb. 3. Ausschnitt einer Einzelkolonie des Typs *M 30/C 1 Gl*, 4 Tage alt, mit Mutantenklonen des Typs *M 30/C 1 sR*

Abb. 4. Wirkung von *C 1*-Phagen auf eine mit *M 30/C 1 Gl* beimpfte Nährbodenplatte (Erklärung im Text)

des aufgesetzten Phagentropfens hängt mit der unter der Flüssigkeit bestehenden schlechteren Sauerstoffversorgung und damit weniger üppigen Entwicklung der streng aeroben Bakterien zusammen. Derselbe Effekt läßt sich auch mit einem phagenfreien Flüssigkeitstropfen erreichen.

3. Bestimmung der Mutationsrate

M 30/C 1 Gl-Sporen (15 min auf 90° C erhitzt) wurden mit Hilfe eines Zerstäuber auf Nährboden (NB) A (Zusammensetzung unter 5.) in Petrischalen fixiert. Die Verdünnung wurde so gewählt, daß etwa 10—20 Einzelkolonien zur Entwicklung kamen. Die Anzahl der in einer Kolonie erfolgten Mutationsschritte wurde durch Auszählen der Sekundärkolonien ermittelt. Die Bestimmung wurde nach 4 Tagen durchgeführt. Bis dahin waren auch die in den Randzonen der Kolonien spät entstandenen Mutationen makroskopisch als Mikrokolonien erkennbar (Abb. 3). Die Gesamtzahl der eine Kolonie bildenden Bakterien wurde nephelometrisch bestimmt (Photometer Eppendorf). Da zu dem Zeitpunkt der Auswertung die *R*-Mutanten weniger als 0,1% der Gesamtzahl der Bakterien ausmachten, wurde die nephelometrisch für eine Kolonie bestimmte Zellzahl bei der Errechnung der Mutationsrate ohne Korrektur für den Mutantenwert eingesetzt. Bei den vorliegenden Versuchsbedingungen war es nicht angebracht, die Mutationsraten pro Bakterium und Zellgeneration zu berechnen, da während der Entwicklung einer Einzelspore zur Kolonie die Zellzahl mit jeder Generation zunimmt. Anders liegen die Verhältnisse z. B. dann, wenn in einem Chemostaten die Zellzahl künstlich konstant gehalten wird. Aus diesem Grunde ist die Mutationsrate pro Bakterium und Bakterienzellteilung berechnet worden. Die

Anzahl der Zellteilungen (n), die zur Bildung einer Kolonie führen, ergibt sich aus der Gesamtzahl der Bakterien (N) als $n = N - 1$. Die Mutationsrate (μ) pro Bakterium und Bakterienzellteilung ist gegeben durch den Quotienten $\mu = \frac{m}{n}$ (m = Anzahl der Mutationsschritte; n = Anzahl der Zellteilungen). Da $n = N$ ist (für hohe Zellzahlen), ist für die Errechnung der Mutationsrate lediglich die Bestimmung der Anzahl der Mutantenklone und der Gesamtzahl der Bakterien einer Kolonie erforderlich. Im Prinzip ist die hier beschriebene Technik mit der von RYAN, SCHWARZ u. FRIED (1955) entwickelten Papillenmethode (angewendet für die Mutation von Histidinbedürftigkeit $\rightarrow$ Histidin-Prototrophie) zu vergleichen.

4. Bestimmung der Phagenadsorption

Für die Bestimmung der Adsorption von C 1 und C 2 an M 30/C 1 Gl bzw. M 30/C 1_S und der Vermehrung der beiden Phagen auf den genannten Bakterienstämmen wurde der streptomycinresistente M 2/str als Indicator benutzt (Ermittlung des Gehalts an freien Phagen).

5. Nährböden

Die Bakterien-Stammkulturen wurden auf NB. E gehalten, auf dem sie optimal sporulieren. Die Bestimmung der Mutationsraten erfolgte auf NB. A (Sporenbildung ist auf diesem sehr nährstoffreichen Substrat nur vereinzelt zu beobachten).

Phagenteste wurden nach der Doppelschicht-Methode durchgeführt (Unterschicht: NB. C mit 1,8% Agar, Oberschicht: NB. A mit 0,8% Agar); bei Verwendung von M 2/str als Indicator Zusatz von 2 γ Streptomycin/ml.

Die Phagen-Stammlösungen wurden in Nährlösung NB. A (steril filtriert durch Membranfilter) bei 4°C aufbewahrt. Die Bebrütungstemperatur war bei allen Versuchen 37°C.

Zusammensetzung der Nährböden:

NB. A: NB. C, angereichert mit Casamino acids (Difco) 0,5% und Yeast extract (Difco) 0,1%.

NB. C: Nutrient broth (Difco) 0,8%; Ca (NO₃)₂ 0,02%; FeSO₄ · 7 H₂O 0,001%; MnSO₄ · H₂O 0,001%.

NB. E: Nutrient broth (Difco) 0,2%; Glucose 0,1%; FeSO₄ · 7 H₂O 0,001%; MnSO₄ · H₂O 0,001%.

pH-Werte für alle Nährböden 6,8—7,0.

Ergebnisse

1. Mutation von Phagenresistenz $\rightarrow$ Phagensensibilität (1. Reversion)

Für eine Anzahl von Kolonien eines Versuchsansatzes wurde a) die Gesamtzahl der Bakterien (N) und b) die Anzahl der Mutationsschritte (m) bestimmt. Insgesamt wurden 120 Kolonien ausgewertet (Abb. 5). Das Verhältnis $\frac{m}{N}$ ergibt für die einzelnen Populationen (Kolonien) jeweils eine bestimmte Mutationsrate. Um die Häufigkeit des Auftretens der Sensibilitätsmutation in verschiedenen großen Populationen zu erfassen, wurden bewußt Kolonien verschiedener Größen (bis zu 2 cm Durchmesser) ausgewertet. Die Größenunterschiede gleichalter Kolonien stehen zur Lage auf der Nährbodenplatte in Beziehung: Freiliegende Kolonien

werden in 4 Tagen wesentlich größer als eng nebeneinander sich entwickelnde. Abb. 5 läßt erkennen, daß mit zunehmender Gesamtzahl der Bakterien einer Kolonie die Anzahl der Mutationsschritte erwartungsgemäß ansteigt. Für die einzelnen Kolonien wurden Mutationsraten von

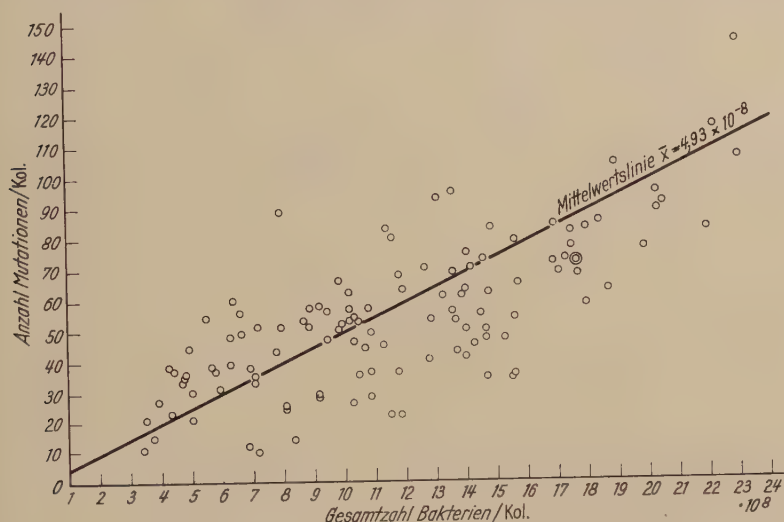


Abb. 5. Gesamtkeimzahl und Anzahl der Mutationen für 120 Kolonien

Tabelle. 1. Berechnung des arithmet. Mittels $\bar{x}$

Mutationsbereich von: ($\cdot 10^{-8}$)	Mitte x_i ($\cdot 10^{-8}$)	Häufigkeit z_i	in Prozent	Abweichung a_i	Prod. $z_i \cdot a_i$
1,25— 2,24	1,75	6	5,00	— 3	— 18
2,25— 3,24	2,75	17	14,16	— 2	— 34
3,25— 4,24	3,75	24	20,00	— 1	— 24
4,25— 5,24	4,75 = x_0	27	22,50	0	— 76
5,25— 6,24	5,75	19	15,84	+ 1	+ 19
6,25— 7,24	6,75	14	11,67	2	+ 28
7,25— 8,24	7,75	6	5,00	3	+ 18
8,25— 9,24	8,75	4	3,34	4	+ 16
9,25— 10,24	9,75	2	1,66	5	+ 10
10,25— 11,24	10,75	1	0,83	6	+ 6
		120	100,00		+ 97
				Summe	+ 21

$$a_i = \frac{x_i - x_0}{d}$$

$$\bar{x} = x_0 + b$$

$$d = 1 \cdot 10^{-8} \text{ (= Klassengröße)}$$

$$b = \frac{21}{120} = 0,175$$

$$b = \text{durchschn. Abweichung von } x_0 \quad 10^8 \bar{x} = 4,75 + 0,175 = 4,93$$

$1,68 \cdot 10^{-8}$ bis $11,25 \cdot 10^{-8}$ ermittelt; die Variationsbreite beträgt somit $9,57 \cdot 10^{-8}$. Das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) beträgt $4,93 \cdot 10^{-8}$ (Tab.1). Die Streuung (s = mittl. quadratische Abweichung) ist 1,88 (Tab.2), der

Tabelle 2. Berechnung der Streuung s

z_i	a_i	a_i^2	$z_i \cdot a_i$	$z_i \cdot a_i^2$
6	—3	9	—18	54
17	—2	4	—34	68
24	—1	1	—24	24
27	0	0	—76	
19	+1	1	+19	19
14	2	4	+28	56
6	3	9	+18	54
4	4	16	+16	64
2	5	25	+10	50
1	6	36	+6	36
			+97	
Summe			+21	425

$$s = \sqrt{\frac{\sum z_i \cdot a_i^2}{N-1} - \frac{N}{N-1} \cdot b^2} = \sqrt{3,57 - 0,03} = 1,88$$

mittlere Fehler des Mittelwertes $\sqrt{\frac{1,88}{120}} = 0,17$. Aus den 120 Populationen ergibt sich somit ein mittlerer Wert für die Mutationsrate von $\mu = (4,93 \pm 0,17) \cdot 10^{-8}$ pro Bakterium und Bakterienzellteilung.

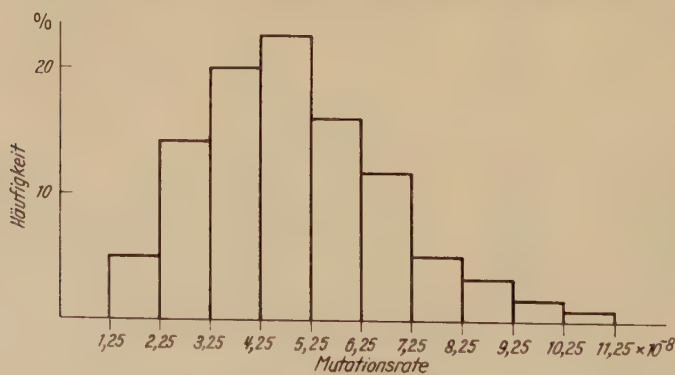


Abb. 6. Häufigkeitsverteilung der Mutationsraten (120 = 100%)

Abb.6 zeigt die Häufigkeitsverteilung der für die einzelnen Kolonien ermittelten Mutationsraten.

2. Adsorption von *C1* bzw. *C2* an *M30/C1* bzw. *M30/C1_sR*

Zu einer Bakteriensuspension (etwa 10^8 Bakt./ml) wurden ca. 10^3 Phagen/ml zugesetzt und der Gehalt an freien (nicht adsorbierten) Phagen fortlaufend bis zu 60 min Reaktionsdauer auf *M2/str* getestet. Ergebnis: *C1* wird nur von *M30/C1_sR* adsorbiert, *C2* von beiden Bakterienstämmen.

3. Vermehrung von *C1* bzw. *C2* auf *M30/C1 Gl* bzw. *M30/C1_sR*

100 ml NL. A wurden jeweils mit 10^6 Bakt./ml beimpft und nach Zusatz von Phagen bei Durchlüftung kultiviert. Zu Beginn des Versuchs und nach 17 Std wurde der Gehalt an freien Phagen auf *M2/str* getestet.

Ergebnis:

Bakt.	C 1 (Konz./ml)		C 2 (Konz./ml)	
	Beginn	17 Std	Beginn	17 Std
<i>M 30/C 1 Gl</i>	110	$3,0 \cdot 10^5$	48	$4 \cdot 10^8$
<i>M 30/C 1_sR</i>	110	$6,2 \cdot 10^8$	48	$9 \cdot 10^9$

Der Versuch zeigt, daß sich *C2* sowohl auf dem *C1*-resistenten *M30/C1 Gl* als auch auf *M30/C1_sR* vermehrt. Der Phage *C1* erreicht demgegenüber nur auf *M30/C1_sR* einen hohen Titer. Daß auch in dem Versuchsansatz mit dem an sich resistenten *M30/C1 Gl* eine Vermehrung der *C1*-Phagen von 110 auf $3,0 \cdot 10^5$ /ml erfolgt ist, liegt wohl daran, daß einmal eine geringe Anzahl von sensiblen Mutanten schon im Impfmateriail enthalten ist und daß bei der Vermehrung der Bakterien weitere Mutanten produziert werden, die infolge ihrer Lysis den Titer für *C1* erhöhen. (Wenn auch der Mutationsschritt zur Sensibilität nur mit einer Rate von $5 \cdot 10^{-8}$ pro Bakterium und Zellteilung erfolgt, so ist der Gehalt an Mutanten in einer Kultur, wie schon an anderer Stelle ausgeführt worden ist, wesentlich größer als 5 in 10^8 Bakterien, weil sich die Mutanten noch vermehren, wenn das maximale Wachstum der Elternbakterien schon erreicht ist. Aus der Populationsverschiebung kann schließlich, wie schon erwähnt, eine Transformation der gesamten Kultur resultieren.)

4. Mutation nach *C2*-Resistenz

C2-resistente Mutanten waren ausnahmslos auch resistent für *C1*, *C1*-resistente Mutanten jedoch sensibel für *C2*.

5. *C1*-Resistenzmutation sensibler *M30/C1_sR*-Bakterien (2. Reversion)

Folgender Versuch sollte über die Mutation sensibel gewordener Bakterien (vom Typ *M30/C1_sR*) zur *C1*-Resistenz Aufschluß geben: Von einem Gemisch aus 10^7 Bakt./ml und $2,5 \cdot 10^8$ Phagen/ml wurde nach

einer Adsorptionszeit von 45 min jeweils 1 ml auf getrockneten NB. A-Platten ausgespatelt und die Anzahl der resistenten Mutanten nach 24 Std ermittelt. Auf 14 Platten (entspricht $1,4 \cdot 10^8$ Bakt.) kamen insgesamt 80 resistente Kolonien zur Entwicklung; davon zeigten 26 den *S*-Typ und 54 den *R*-Typ (es ist zu berücksichtigen, daß diese Werte nichts über die Mutationsrate aussagen). Das Ergebnis zeigt, daß bei der Reversion eines Merkmals nicht unbedingt der status quo in bezug auf andere Merkmale restauriert werden muß: *CI*-resistente Bakterien vom *S*-Typ (*M30/CI Gl*) mutieren zum *R*-Typ und werden dabei gleichzeitig sensibel für *CI*. Diese Sensiblen können ihrerseits nun wieder nach *CI*-Resistenz mutieren. Das morphologische Merkmal der resistenten Ausgangsform (*S*-Typ) muß aber nicht zwingend an den Resistenzmutationsschritt gekoppelt sein. Es ist anzunehmen, daß in umgekehrter Weise bei der Mutation von *M30/CI Gl* nach *CI*-Sensibilität auch sensible Bakterien vom *S*-Typ auftreten (so daß die Mutationsrate für die Reversion zur Sensibilität auf beide morphologische Typen bezogen höher liegt, als für den *M30/CI_sR*-Typ ermittelt wurde. Das Erkennen der Sensiblen vom *S*-Typ ist mit der für die Gewinnung der *R*-Typen entwickelten Technik jedoch nicht möglich). Es konnte nachgewiesen werden, daß vereinzelt in einer Population von *M30/CI Gl* auch Rauhformen auftreten, die für *CI* nicht sensibel sind, sondern sich resistent verhalten (Typ *M30/CI R*). Da die Größenordnung bei $10/100$ der sensiblen *R*-Formen liegt, sind die für den Mutationsschritt *M30/CI Gl* $\rightarrow$ *M30/CI_sR* ermittelten Raten durch diesen Faktor ebenfalls nur mit einem Fehler von $10/100$ belastet.

Diskussion

Die Fähigkeit, für Gifte und schädigende Einwirkungen anderer Art resistent zu werden, zählt zu den auffallendsten Eigenschaften tierischer wie pflanzlicher Organismen. Das Auftreten resistenter Typen bei der chemischen Bekämpfung krankheitserregender Mikroorganismen und schädlicher Insekten ist für Medizin und Landwirtschaft von größter praktischer Bedeutung. Diese Tatsache hat dazu beigetragen, daß den Resistenzerscheinungen auch von Seiten der theoretischen Biologie sehr großes Interesse entgegengebracht worden ist. Es darf heute als experimentell erwiesen betrachtet werden, daß resistente Typen (Varianten) in Bakterienpopulationen durch Mutation entstehen. Soweit hierüber genaue Analysen durchgeführt wurden, beruht das Resistentwerden einer Kultur nicht darauf, daß die Gesamtheit der Individuen einer ursprünglich sensiblen Population durch physiologische Adaptation die Resistenz „erwirbt“, sondern auf der selektiven Entwicklung einzelner resistenter Mutanten. Das gilt für die Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Substanzen (z. B. Sulfonamide, Antibiotica) (DEMEREK 1948, LURIA 1946, OAKBERG u. LURIA 1947, WATANABE u. Mitarb. 1957) ebenso wie

für die Phagenresistenz. Man muß sich der Tatsache bewußt sein, daß die Eigenschaften von Bakterienkulturen aus der Summe der Eigenschaften einer sehr großen Zahl von Einzelzellen resultieren, und daß eine Bakterienkultur im genetischen Sinne eine sehr heterogene Population darstellt, auch wenn ihre Entwicklung von einer einzelnen Zelle ausgegangen ist. Solange spontan auftretende Mutanten in einer Population den übrigen Individuen gegenüber ohne Selektionsvorteil sind, treten sie infolge zahlenmäßiger Unterlegenheit nicht in Erscheinung. Erst das Anlegen eines Selektionsfaktors (z. B. Phage oder Antibioticum) oder das natürliche Vorhandensein eines Selektionsvorteils (z. B. schnellere Vermehrung) läßt die Mutanten in Erscheinung treten. Während bei der Antibiotica-Resistenz ein stufenweises „Hinaufmutieren“ (bis zur Verträglichkeit einer maximalen Grenzkonzentration) zu beobachten ist, kennt die Phagen-Resistenz keine Zwischenstufen: Die Bakterien besitzen entweder vollständige Resistenz, oder sie verhalten sich sensibel. Für das Streptomycin konnte WATANABE (1957) den Beweis erbringen, daß die Substanz selbst keine spezifisch mutagene Wirkung besitzt, und daß allein Spontanmutation und Selektion das Aufkommen von resistenten Typen bestimmen. Die spontane Mutationsrate läßt sich aber z. B. durch Strahleneinwirkung erhöhen (RUBIN 1954; für Streptomycin-Resistenz).

Die Resistenz gegenüber Phagen ist im allgemeinen mit der Unfähigkeit der Bakterien zur Phagenadsorption verknüpft. Es fehlt den Resistenten die notwendige Receptorsubstanz (BEUMER 1953). Da jedoch Resistenzmutanten bekannt sind, die ohne nachfolgende Lysis den Phagen adsorbieren, und da selbst eine erzwungene Lysis phagenresistenter Mutanten möglich ist (WEIDEL 1952), ist der Begriff „Resistenz“ nach JACOB u. Mitarb. (1953) auch für alle hinsichtlich des Mechanismus nicht geklärten Fälle der Widerstandsfähigkeit gegenüber Phagen anzuwenden. Die prophagen-induzierte Widerstandsfähigkeit lysogener Bakterien für ihren homologen Phagen wird demgegenüber als „Immunität“ bezeichnet.

Daß eine Resistenzmutation mit morphologischen Änderungen im Kolonietyp gekoppelt sein kann, wie bei der *C1*-resistenten Mutante *M30/C1 Gl* (Abb. 1), ist mehrfach beschrieben worden (LURIA u. DELBRÜCK 1943). Auch die Kopplung von Phagenresistenz mit bestimmten Stoffwechseländerungen (DELBRÜCK 1948, GOTS u. Mitarb. 1954, WOLLMAN 1947), mit Änderungen im Verhalten gegenüber anderen Phagen (BRANDIS 1956) und Antibioticis (WALLMARK 1954) sowie mit Virulenzänderungen der Bakterien (PARK 1956) wurde beobachtet. Für verschiedene Phagen treten bei der Resistenzmutation charakteristische Raten auf (DEMEREK u. FANO 1945). Die Spontanmutation zur Phagenresistenz kann, wie bei der Antibioticaresistenz, durch mutagene Agentien verstärkt werden (GEZELÖIUS u. FRIES 1952, KAPLAN 1950). Bei

UV-induzierten Resistenzmutationen ist der Typ der Resistenten (untersucht für *B/T1*) in bezug auf das Verhalten gegenüber anderen Phagen von den spontan entstehenden Resistenten verschieden (BRYSON u. DAVIDSON, 1951). Die Resistenzmutation scheint sehr häufig durch Pleiotropie ausgezeichnet zu sein.

Über den Populationswechsel zwischen *S*- und *R*-Typen liegen hinsichtlich der Beziehung zum Stoffwechsel der Bakterien verschiedene Untersuchungen vor (ALTENBERN u. GINOZA 1954, ALTENBERN u. Mitarb. 1957). IVANOVICS u. Mitarb. (1957) isolierten aus einer *S*-Typ-Kultur von *Bac. megaterium* eine *R*-Mutante, die sich im Gegensatz zur Ausgangskultur für einen Phagen als resistent erwies. Die Mutation von *M30/C1 Gl* nach *M30/C1_sR* beweist, daß auch der genau umgekehrte Fall vorkommt, so daß solche Beziehungen nicht verallgemeinert werden können.

Schon einleitend wurde darauf hingewiesen, daß es sich bei den phagen-resistenten Varianten in einer sensiblen Kultur um unabhängig von den Phagen entstandene Mutanten handelt (indirekte Beweise durch LURIA u. DELBRÜCK 1943; direkte Beweise mit der Replikatechnik durch J. u. E. LEDERBERG 1952). Daß spontan und von Phagen unabhängig in einer Kultur resistenter Bakterien auch sensible Mutanten auftreten, haben die eigenen Untersuchungen gezeigt. Da die Mutationsschritte bei diesem System direkt gezählt werden können, sind die Voraussetzungen für quantitative Mutationsstudien besonders günstig. Die Ermittlung der Mutationsrate wird nicht durch Differenzen in der Vermehrungsgeschwindigkeit von Elternbakterien und Mutanten beeinträchtigt (was bei indirekten Methoden möglich ist), und auch eine Verzögerung in der phänotypischen Ausbildung der Sensibilitätsmutationen, wie sie NEWCOMBE (1948) für Resistenzmutationen beobachtet hat, ist bei der angewandten Technik für die Bestimmung der Mutationsrate ohne Bedeutung.

Bei der Mutation von *M 30* → *M 30/C 1 Gl* bleibt die Sensibilität für *C 2* erhalten. Demgegenüber verhalten sich aus *M 30* gewonnene *M 30/C 2*-Mutanten, soweit beobachtet, gleichzeitig resistent für *C 2* und *C 1*.

Die Reversion von Resistenz → Sensibilität ist in dem untersuchten System so eng an die Reversion von Glatt-Typ → Rauh-Typ gekoppelt (nur etwa 1‰ der Rauh-Mutanten sind nicht sensibel), daß sich aus der Ermittlung der *R*-Mutationen die Bestimmung der Sensibilitätsmutationen ergibt, soweit es sich um Sensible vom *R*-Typ handelt. Daß Kopplungen zwischen Rauh, Glatt, Resistenz und Sensibilität in den verschiedenen Kombinationen möglich sind, zeigt die Resistenzmutation einer durch Mutation entstandenen sensiblen *R*-Kultur (2. Reversion), bei der resistente *S*- und *R*-Typen im Verhältnis von 1:2 auftraten. Das Rückmutieren nur eines der beiden bei der Mutation zur Sensibilität gekoppelten Merkmale kann auf der Wirkung eines Suppressor-Gens beruhen. Bei

der Einbeziehung weiterer (physiologischer) Merkmale würde sich vermutlich noch deutlicher zeigen lassen, daß Reversionen, die ein bestimmtes Merkmal betreffen, nur selten den status quo wiederherstellen.

Zusammenfassung

Für die spontane und von Phagen unabhängige Mutation von Phagenresistenz $\rightarrow$ Phagensensibilität (1. Reversion) wurde bei *Bac. megaterium* M 30/C 1 Gl eine Mutationsrate von $(4,93 \pm 0,17) \cdot 10^{-8}$ pro Bakterium und Bakterienzellteilung ermittelt. Da der Mutationsschritt zur Phagensensibilität mit einer Änderung des Koloniecharakters eng gekoppelt war, konnte die Anzahl der sensiblen Mutantenklone in resistenten Bakterienpopulationen (Kolonien) direkt bestimmt werden. Bei der Resistenzmutation sensibler Mutanten (2. Reversion) wurde festgestellt, daß an die Rückmutation zur Phagenresistenz nicht unbedingt die Wiederherstellung des morphologischen Merkmals der ursprünglich resistenten Bakterien gekoppelt sein muß.

Literatur

- ALTENBERN, R. A., and H. S. GINOZA: J. Bact. **68**, 570 (1954). — ALTENBERN, R. A., H. S. GINOZA and D. R. WILLIAMS: J. Bact. **73**, 691 (1957). — ALTENBERN, R. A., D. R. WILLIAMS, J. M. KELSH and W. L. MAUZY: J. Bact. **73**, 697 (1957). — BEALE, G. H.: J. Gen. Microbiol. **2**, 131 (1948). — BEUMER, J.: Ann. Inst. Pasteur **84**, 15 (1953). — BRANDIS, H.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **165**, 305 (1956). — BRYSON, V., and H. DAVIDSON: Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) **37**, 784 (1951). — DELBRÜCK, M.: J. Bact. **56**, 1 (1948). — DEMEREC, M.: J. Bact. **56**, 63 (1948). — DEMEREC, M., and U. FANO: Genetics **30**, 119 (1945). — GEZELIUS, K., and N. FRIES: Hereditas (Lund) **38**, 112 (1952). — GOTS, J. S., W. Y. KOH and G. R. HUNT jr.: J. Gen. Microbiol. **11**, 7 (1954). — GRAHAM, D. M., and F. E. NELSON: J. Dairy Sci. **36**, 563 (1953). — IVANOVICS, G., L. ALFÖLDI and A. SZELL: Acta microbiol. Acad. Sci. hung. **4**, 333 (1957). — JACOB, F., A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN: Ann. Inst. Pasteur **84**, 222 (1953). — KAPLAN, R. W.: Naturwissenschaften **37**, 308 (1950). — KLECZKOWSKA, J.: J. Gen. Microbiol. **4**, 298 (1950). — LABRUM, E. L.: Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) **39**, 280 (1953). — LEDERBERG, J., and E. M. LEDERBERG: J. Bact. **63**, 399 (1952). — LURIA, S. E.: Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. **11**, 130 (1946). — LURIA, S. E., and M. DELBRÜCK: Genetics **28**, 491 (1943). — NEWCOMBE, H. B.: Genetics **33**, 447 (1948). — OAKBERG, E. F., and S. E. LURIA: Genetics **32**, 249 (1947). — PARK, B. H.: Virology **2**, 711 (1956). — RUBIN, B. A.: Genetics **39**, 296 (1954). — RYAN, FR. J., M. SCHWARTZ and PH. FRIED: J. Bact. **69**, 552 (1955). — SCHOLTENS, R. T.: J. Hyg. (Lond.) **36**, 452 (1936). — STOLP, H.: Arch. Mikrobiol. **26**, 55 (1957). — WALLMARK, G.: Acta path. microbiol. scand. **34**, 191 (1954). — WATANABE, TS., T. FUKASAWA and D. USHIBA: J. Bact. **73**, 770 (1957). — WEIDEL, W.: Z. Naturforsch. **7b**, 145 (1952). — WOLLMAN, E.: Ann. Inst. Pasteur **73**, 348 (1947).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn)

Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentrischen Diatomeen

III. Die Spermatogenese von *Melosira moniliformis* Agardh

Von

H. A. VON STOSCH*

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. April 1958)

Bei der Schilderung der oogamen Entwicklung von *Melosira varians* (v. STOSCH 1951) blieben Lücken, die die Vorgänge bei der Meiosis in den Spermatogonien, insbesondere die Bildung der Geißeln, betrafen. Diese konnten bei dem recht kleinen Objekt, das damals auch nur vom natürlichen Standort zur Verfügung stand, nicht im Leben untersucht werden. Bei einem Aufenthalt in List auf Sylt war es möglich, die fehlenden Beobachtungen an der größeren marinen Art *Melosira moniliformis* nachzuholen. Diese verhält sich in den typologisch wichtigen Punkten wie die früher beschriebene Süßwasserform.

Material und Methode

Die gewöhnlich in Rasen von Benthosalgallen eingewebt lebende fadenbildende Diatomee wurde am 19. 8. 1953 aus einer Planktonprobe isoliert und der Klon darauf in Erdschreiberlösung kultiviert, die 10 mg SiO_2 /l. zusätzlich enthielt. Sie ging in der dritten Subkultur bei etwa $40\ \mu$ Breite der Zellen nach einer Zeit vegetativer Entwicklung in Spermatogonbildung über und zwar bevorzugt an den Stellen der Fäden, welche mit dem Boden der Gefäße und seinem Bakterienaufwuchs in Berührung waren. *M. varians* verhält sich kultiviert ganz ähnlich. Auxosporen entstanden damals nicht, doch wurde 1954 in List erneut ein Klon angezogen und später in Darmstadt weiter gehalten. Dieser lieferte neben Spermatogonen auch eine Anzahl Auxosporen, die als vergrößerte Stämme weitergeführt werden konnten. Die Art ist also, wie alle bisher näher daraufhin untersuchten *Centrales* (etwa 20) einhäusig.

Aus den Kulturen wurden in Spermatogenese befindliche Fäden in die früher beschriebene Durchströmungskammer (v. Stosch 1954) eingebracht. Sie befanden sich damit in Nährlösung zwischen dem Deckglas und einer gespannten Zellophanmembran, die letztere auf der Unterseite vom Nährmedium bespült, und konnten mit der Wasserimmersion $90\times$ Ap. 1,20 von Leitz beobachtet und photographiert werden. Die Abbildungen wurden zum größten Teil durch (zum Teil kombinierendes) Überzeichnen der Mikroaufnahmen, zum kleineren nach während der Beobachtung gefertigten Skizzen hergestellt. Dauerpräparate (Alkohol-Eisessig, EKE) wurden nach den früher verwendeten Methoden angefertigt (v. Stosch 1956).

* Herrn Professor Dr. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

Beobachtungen

Wie für *Melosira varians* geschildert, gehen auch bei *M. moniliformis* die Spermatogonien als etwas vereinfachte Zellen geringerer Höhe durch eine Anzahl von Differenzierungsteilungen aus der vegetativen Zelle hervor, so daß Gruppen von 4, 8, 16, 32 oder vielleicht noch mehr Gonotokonten entstehen. Doch kommen durch verzögertes Umschalten zur Meiosis auch Zahlen vor, die nicht Potenzen von 2 sind. So zeigt Abb. 1 a links zwei vegetative Zellen, anschließend eine Gruppe von 4 Spermatogonen, als erste Untereinheit eines Komplexes von 16 Zellen. Deren beide ersten Zellen machen später noch je eine weitere, also überzählige, Teilung durch; die beiden nächsten (Abb. 1 b) sind in Prophase der Meiosis; die daran nach rechts anschließenden beiden Zellen repräsentieren eine weitere Untergruppe von 4 Zellen, die aber die letzte Zytokinese nicht ordnungsgemäß durchführten, ein häufiger Defekt in unserem Material. Sie sind ebenfalls in meiotischer Prophase.

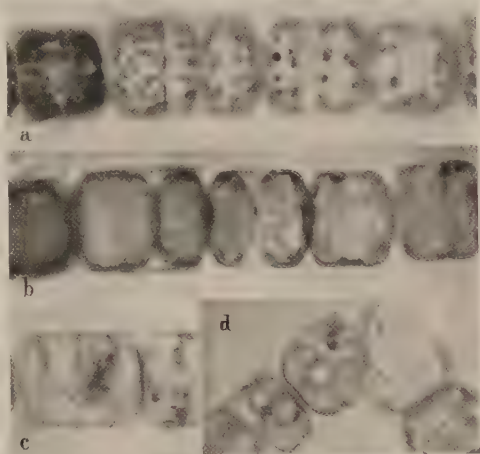


Abb. 1. Männliche Fäden von *M. moniliformis* (600fach). a u. b Gleiches Fadenstück mit und ohne Blaufilter. Frühe meiotische und prämeiotische Stadien. c Doppelspermatogon reif, 5 von den 8 Spermien sichtbar. d Spermatogonpaar öffnet sich. Die linke Zelle enthält zahlreiche Bruchstücke des Restkörpers

Es wird deutlich, daß die Plastiden während der Differenzierungsteilungen an Zahl je Zelle, Größe und Farbstoffgehalt abnehmen, wie das für *M. varians* geschildert wurde. Vermutlich stehen Größenabnahme und Nichtvermehrung in Zusammenhang. Als dritte Komponente tritt in diesen Nexus eine wahrscheinliche Erniedrigung der Generationsdauer dieser Zellen ein. Die letztere wurde zwar nicht direkt bestimmt, läßt sich aber an der Verringerung der Schalendicken im Verlauf der Teilungen ablesen. Die Hypovalven der Spermatogonien selbst sind zart, enthalten jeder erkennbaren Feinstruktur und auch des Schalenmantels.

Spermatogonmutterzellen, bei denen die letzte Furche nicht „durchkam“, scheiden an deren Oberfläche Membransubstanz aus, die sich bruchsackartig in das Lumen vorwölbt (Abb. 1 b, 1. und 2. Zelle von rechts; Abb. 1 c). Sie sind entweder 2kernig (2. Zelle von rechts) und liefern schließlich 8 Spermien, oder sie bilden einen Restitutionskern (1. Zelle von rechts), dessen Schicksal nicht bekannt ist.

Die Meiosis wurde vielfach in Einzelstadien ihres Ablaufs gesehen. Durchbeobachten konnten wir sie an 2 Schwesterzellen (1 und 2 der Abb.3) von der Prophase bis zur Ausbildung der Spermien. Die zeitlichen Verhältnisse gibt die Legende von Abb.3.

In jeder Telophase der Mitose rücken die Tochterkerne bei Diatomeen zunächst in das Zentrum der neu zu bildenden Membran. Nach deren Fertigstellung wandern sie bei *Melosira* in die Oberschale, wo sie bleiben, um schließlich gegen Ende der prophasischen Zellstreckung in den Wandbelag des Zelläquators zu gelangen (Abb.2). Deutliche Prophasenstruktur der Kerne wird erst dann sichtbar. Da in der Interphase bei *Melosira* (siehe v. STOSCH 1951) Valvenrand auf Valvenrand sitzt, kann der Gürtel der Unterschale erst bei diesem Auseinanderweichen der Schalen gebildet werden.

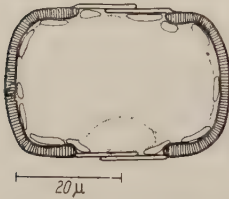


Abb. 2. PräspERMATOGON von *M. moniliformis* in später Prophase einer der differenzierenden Teilungen (Mitose)

Auch in der Einleitung der Meiosis findet diese umständliche Kernwanderung statt. Doch beginnt die meiotische Prophase schon in der Hypovalva. Etwa im frühen Pachytän erfolgt die Wanderung in die Oberschale und vom späten Pachytän an, dem bei Diatomeen kein erkennbares Diplotän, sondern direkt die Diakinese folgt, findet er sich dann im Zelläquator; er ist hier aber im Gegensatz zur mitotischen

Prophase nicht fixiert, sondern pendelt um diese Ruhelage, was im Leben gut zu beobachten ist. Ebenfalls abweichend von der Mitose geht dieser Wanderung in die Gürtellage keine Zellstreckung voraus; sie ist in die Zeit um die erste Teilung verschoben, und wenn sie erfolgt, wird ein Gürtel an der Unterschale nicht gebildet.

In der prämeiotischen Interkinese treten nur noch kleine schwach färbare Nukleolen wieder in Erscheinung. Sie werden im Gegensatz zu *M. varians*, wo sie länger persistieren, schon in der frühen Prophase aufgelöst und in der Interphase zwischen den Reduktionsteilungen waren sie zwar im Leben zu erkennen (Abb.3f), färberisch aber nicht nachzuweisen. Gleichlaufend mit diesen RNS haltenden Organen des Kerns verschwindet auch die Färbbarkeit des Plasmas, die sehr wahrscheinlich auf dessen Gehalt an Ribonukleinsäuren beruht. Auch das scheint ein allgemeines Verhalten während der Spermatogenese der Centrales zu sein. So wurde bei *Biddulphia*-Arten (v. STOSCH 1956) bei noch stärkerer Spezialisierung der Spermatogone früher Verlust der Nukleolen und der Basophilie des Plasmas beobachtet.

Zur Metaphase (Abb.3d) scheint der Kern meist in die Hohlkehle zwischen Schalenfläche und Schalenmantel der Oberschale verschoben zu werden. Er teilt sich hier mit schräg zur Längsachse des Fadens gestellter Spindel, so daß die beiden Tochterkerne nicht in die gleiche

Radialebene zu liegen kommen (Abb. 3b, e). Eine Zerschnürung des Plasmas unterbleibt; der Interphasenprotoplast ist ein 2kerniges Plasmodium.

Kurz vor der 1. Metaphase beginnt die Zelle sich zu strecken, d. h. die Hypovalva aus der Ruhelage heraus gegen die Schwesterzelle als Widerlager zu drücken und dadurch den Gürtel der Mutterzelle beider Spermatogonien auseinanderzuschieben (Abb. 3c). Der Vorgang dauert

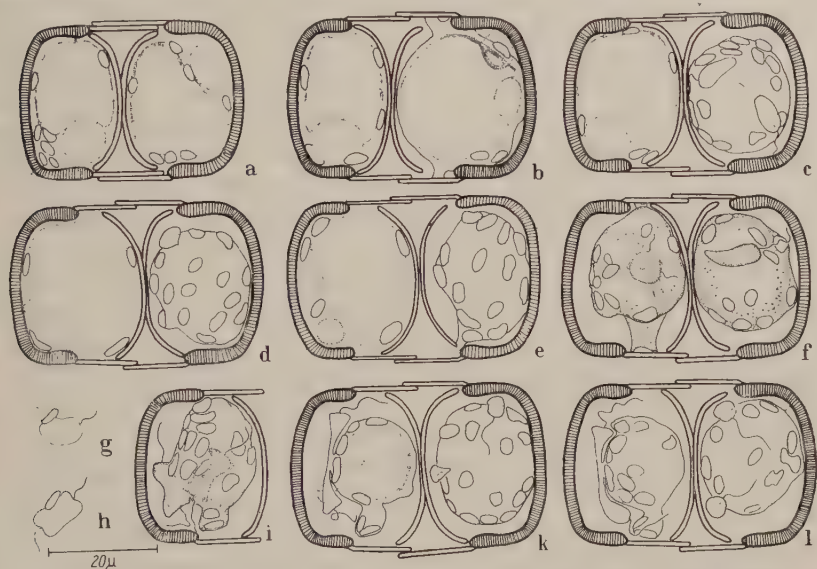


Abb. 3. Meiosis und Spermiententstehung in Spermatogonpaar (rechts „Zelle 1“, links „Zelle 2“) von *M. moniliformis* nach Dauerbeobachtung: Beginn 21. 9. 1953, 17⁰⁰. Zellen kürzlich durch Teilung entstanden; a 22. 9., 11⁴⁰, Z. 1 beginnt sich zu öffnen (etwa Metakinese), Z. 2 in später Prophase; b 12⁴⁰, Z. 1 Kontraktion des Protoplasten beginnt, Interphase. Um 13³⁰ werden in Z. 1 Geißeln sichtbar, um 14⁰²–14¹⁸ läuft die zweite Teilung ab; c 14³⁵, Z. 1 Spermien umkreisen den Restkörper, Z. 2 beginnt sich zu öffnen; d 15¹⁴, Z. 2 Kern in Teilung; e 15³⁰, Z. 2 frühe Interphase. Zelle maximal gestreckt. Um 15³² beginnt sich der Protoplast von der Wand abzulösen; f 16¹⁶, Z. 2 Geißeln am oberen Kernhügel, der andere Kern in der Vorwölbung links unten; g 16⁴⁴, Z. 2 oberer Kumulus mit Geißeln und Plastid; h 16⁴⁷ ebenso; i 16⁴⁹, Z. 2 Kerne in Anaphase; k 16⁵², Spermien von Z. 2 werden abgestemmt, von der oben liegenden war nur das eine, anomalerweise einen Plastiden führende noch zu sehen; l 16⁵⁴ ebenso, Körper des unteren Spermiums rundet sich. 18⁰⁵ waren die Spermien in beiden Spermatogonien noch in Bewegung um den Restkörper. Beobachtung abgebrochen

30–40 min in die Interphase hinein und kommt dann zur Ruhe. Einige Zeit danach hebt sich der Protoplast von der Wand ab und fällt in Spontanplasmolyse allmählich auf weniger als die Hälfte des maximalen Volumens zusammen. Das beginnt mit einigermaßen gerundeten Menisken an der Schalenfläche. Dagegen sind die Gürtelregionen „negative Plasmolyseorte“, zu denen sich das Plasma in einzelnen Strängen oder in breiten Fortsätzen noch etwa bis zum Ende der Teilungsvorgänge hinspannt. In den Abbildungen kommt das nicht immer zum Ausdruck,

da die ihnen zugrundeliegenden Photos nur einzelne Ebenen darstellen. Würde die Schwellung in beiden Schwesterspermatogonien synchron laufen, so sollten durch sie die Schalen der Mutterzelle geöffnet werden. Da das aber, wie in dem hier geschilderten Beispiel, sehr oft nicht der Fall ist, schiebt nach dem Nachlassen des Turgors im ersten Spermatogon, das zweite nur dessen Unterschale in ihre Ruhelage zurück (Abb. 3d), ohne daß der Öffnungsgrad der Mutterzelle beeinflußt wird. Tatsächlich findet man auch im fixierten Material sehr häufig Spermatogonpaare, die zwar reif, aber noch nicht getrennt sind. Wie man die Schwellung des Protoplasten als eine verzögerte Prophasestreckung der Zelle auffassen kann,



Abb. 4. Doppelspermatogon von *M. moniliformis* in Interphase der Meiosis. Vom Hauptplasma mit der Vakuole geht nach vorn ein kurzer Fortsatz aus, enthaltend 2 Interphasenkerne mit Geißelpaaren, ein zweiter längerer nach rechts mit den beiden anderen Kumuli an einem Plasmaballen

so liegt für die darauffolgende Deplasmolyse eine Deutung im Zusammenhang mit der normalen Zytokinese der *Centrales* nahe. Bei dieser wird während der Furchung und der häufig auf sie folgenden Spontankontraktion ein erheblicher Volumverlust des Zellinhaltes bezogen auf die Mutterzelle herbeigeführt (bei *Stephanopyxis* um etwa 30%). In der Meiosis von *Melosira* würden sich also beide Prozesse, die prophasische Streckung und die an die Kinesen des Kerns gebundene Kontraktion verspäten und ein relatives Unabhängigwerden von Kern- und Plasmavorgängen resultieren, wie es auch von anderen Objekten aus Tier- und Pflanzenreich bekannt ist.

In der frühen Interkinese sind die Kerne im Leben schlecht zu erkennen, da sie zunächst eingeschlossen im Wandbelag liegen. Dann aber treten sie in Hügeln, die sich immer stärker profilieren, über die zurückweichende Plasmaoberfläche hervor. Der Grund dafür könnte in einer Erniedrigung der Oberflächenspannung am Plasmalemma liegen. Für sie spräche dessen Neigung zur Amöboidie in diesem Zeitraum, die sich in der Bildung fadenförmiger Pseudopodien ausdrückt. Die Kerne würden also durch die Spannung des Tonoplasten emporgehoben. Es erscheint aber fraglich, ob dieses die Ursache oder die allein wirksame Ursache ist, da es auch zu knospenartiger Herausmodellierung der Kerne und ihrer plasmatischen Umgebung kommen kann, wenn die Vakuole anormalerweise nicht in Kernnähe ist (Abb. 4). Das zeigt die Existenz nicht in der Gesamtkonstellation der Zelle liegender, sondern in der nächsten Umgebung der Kerne wirkender „Gestaltungskräfte“ an.

Etwa 50 min nach der Metaphase, nachdem etwas über die Hälfte der Interkinese verstrichen war, wurden an den Kernhügeln der Zelle 2 die Geißeln sichtbar (Abb. 3f). Sie waren zu der Zeit schon auseinander-

gerückt. Doch entstehen sie wie bei anderen Diatomeen (v. STOSCH 1956) zu zweien von einem Punkt entspringend als kurze nur wenig bewegte Stummel (Abb.4), die dann gleichmäßig heranwachsen. Während des Auseinanderweichens ihrer Basalpunkte verlängern sie sich weiter und Frequenz wie Amplitude ihrer Bewegung wächst. Dabei nimmt der Kumulus nierenförmige Gestalt an (Abb.3g); die Geißeln entspringen aus leichten Vertiefungen an diesem Körper. Schließlich stehen sie einander genau gegenüber. Der Kernhügel hat dann in der Aufsicht fast rechteckige Form bekommen (Abb.3h); das entspricht wohl dem Kernzustand der Metaphase. Die Diatomeen besitzen eine Zentralspindel, die seitlich an den Prophasekern herantritt, erst nur kurz ist und sich gegen die Metaphase hin streckt. Es ist anzunehmen, daß die Basalkörner der Geißeln mit den Zentren der Spindel in naher räumlicher Beziehung stehen und deren Weg bei der Formänderung und Wanderung der Spindel etwa markieren. Zytologisch nachweisen konnten wir diese Beziehungen aber noch bei keinem Objekt. Die Spindelfigur wird eingehüllt von dem Plasmaanteil, der später die Spermienkörper bildet. Plastiden werden im allgemeinen nicht in den Hügel aufgenommen. Die Spermien sind gewöhnlich plastidenlos und der in Abb.3g—k gezeigte Kernhügel stellt eine seltene Ausnahme dar. Die Wanderung der Plastiden und die Drehung der Kernfigur (Abb.3g—h) demonstrieren, daß zu diesem Zeitpunkt im Plasma starke Bewegungsvorgänge ablaufen.

Die Anaphase deutet sich durch die Einschnürung der Kumuli (in Abb.3 im Profil und von oben zu sehen) an. Sie werden nun im Verlaufe weniger Minuten und synchron für beide Teilungskerne zu schlanker Sanduhrform gestreckt. Wirksam ist dabei wohl der Stemmkörper, der vielfach bei Diatomeen zu enormer Verlängerung fähig ist. Er drückt das in den breiten Teilen an den Polen der Figur befindliche Kernmaterial vom Plasmarestkörper (Abb.3 k, l) ab. Außerdem muß man wohl eine gleichzeitige, die Basis des Kumulus einschnürende Plasmafurchung annehmen. Während des Auseinanderweichens nimmt die Schlagfolge der Geißeln stark zu und die Vorgänge im Spermatogon werden turbulent. Man hat den Eindruck, daß die Schwimmbewegung der sich individualisierenden Spermien die völlige Ablösung vom Restkörper wesentlich mitübernimmt. Durch diesen eigentümlichen Vorgang entstehen aus dem zweikernigen Plasmodium simultan 5 Einzelkörper, die vier Spermien und der Plasmarest, welcher die Hauptmenge des Zytoplasmas, die Plastiden und eine große Vakuole enthält.

Normalerweise liegen die Kumuli bei der Teilung mindestens $\frac{1}{3}$ Zellumfang voneinander entfernt. Bei dem Doppelspermatogon der Abb.4, hervorgegangen aus einer „misdivision“ bei der letzten Differenzierungsteilung, lagen je 2 Interphasenkerne dicht beisammen. Beide Gruppen sind vom vakuolenführenden Hauptplasma durch Stränge getrennt. Die

gesteigerte Amöboidie, die das wohl verursacht, ist auch an den ausgestülpten Plasmafingern zu erkennen.

Die freien Spermien sind äußerst aktiv. Sie kreisen in rascher Bewegung in der Zelle und zwar in engem Kontakt mit dem Plasmarestkörper, dessen Oberfläche eingedrückt und deformiert wird, während sie ihn etwa in Großkreisen umfahren. Sie sind zunächst schlank tropfenförmig, tragen am gerundeten Vorderende die Geißel und sind am Hinterende zu einem langen aus der Stemmkörperhälfte als Achse und umgebendem Plasma bestehenden (Abb. 3c) Schwanz ausgezogen. Nach Erfahrungen an Objekten, bei denen in der Anaphase der meiotischen und prämeiotischen Teilungen die Stemmkörper durch Zerreißen der Plasmahülle freigelegt werden („Mikrosporen“ von *Biddulphia mobiliensis* und *Lithodesmium*), ist anzunehmen, daß die Halbspindel allmählich in den Körper des Spermiums zurückgezogen und in ihn eingeschmolzen wird. Das Plasma des Schweifes scheint durch die Bewegungen am Restkörper abgestreift zu werden. Schließlich sind die Hinterenden der Spermien unter Beibehaltung der Tropfenform leicht gerundet (Abb. 1c, 3f).

Die kreisende Bewegung der Spermien erweckt den Eindruck thigmotaktischer Bindung an den Restkörper. Diese ist in den ersten Momenten der Individualisierung etwas geringer, wird aber bald so fest, daß kein auch nur kurzfristiges Sichablösen der Spermien von der Oberfläche zu beobachten ist. Diese Bewegung der Spermien geht in unverminderter Heftigkeit stundenlang weiter. In Zelle 1 des abgebildeten Beispiels wurde sie während $4\frac{1}{2}$ Std bei Zelle 2 $1\frac{1}{2}$ Std lang beobachtet. Dann wurde die Beobachtung abgebrochen, ohne daß sich die Spermatogone geöffnet hatten. In Zelle 1 war lediglich der Grad der Taxis etwas geringer geworden. Die Aktivität der Spermien scheint dafür verantwortlich zu sein, daß im älteren und sich öffnenden Spermatogon der Plasmarestkörper in eine Unzahl von kleineren und größeren Partikeln zerschlagen ist. Zu diesen besteht dann taktische Bindung nicht mehr, die Spermien bewegen sich frei und unorientiert in der Zelle.

Eine „Nachreifung“ der Spermatogone und die Taxis der Spermien fehlt bei *M. varians*. Hier erfolgt das Öffnen wenige Minuten nach der Fertigstellung der Spermien. Daß die große Zeitspanne zwischen Ablösung und Entlassung der Spermien bei *M. moniliformis* nicht durch Einflüsse der Beobachtung verursacht ist, ergibt sich aus der Statistik der Stadien in fixiertem Material. Bei *M. varians* fanden sich unter 860 Spermatogonen in meiotischen und postmeiotischen Zuständen nur 6 unreife „Tetraden“ und 2 reife ungeöffnete Spermatogone (0,25%), bei *M. moniliformis* aber waren die entsprechenden Zahlen 176, 1 und 58 (33%)!

Der Grund für diese Verspätung in der Entlassung der Spermien muß wohl in deren taktischem Verhalten gesehen werden. So lange es besteht, richtet es die Bewegungen so, daß steile Stöße gegen die Valven verhindert werden. Erst wenn der Restkörper seine Attraktivität verliert, wird die Kinetik in der Zelle ideal ungeordnet und die Hypovalven geraten unter den „Druck“ der Einzelstöße, der zunächst die Hälften der Mutterzelle trennt und darauf die Unterschalen vollends heraustreibt. Fragt man nach der Natur dieser Taxis, so liegt die Vermutung nahe, daß ihr chemische Reize zugrundeliegen und daß der Plasmarestkörper anlockende Stoffe entläßt — vielleicht von konstitutioneller Verwandtschaft mit dem weiblichen Gamon — die allmählich exosmieren und dadurch die Taxis zum Erlöschen bringen.

Im Leben war der Kern der Spermien nicht zu erkennen. Doch konnte er in fixiertem Material mit seiner großen Zahl ungeöffneter Spermatogone genauer studiert werden (Abb. 5). Er liegt unerwarteter Weise am Hinterende; distal läßt sich gelegentlich an ihm ein Körper erkennen, wohl das Basalkorn, von dem die Geißel entspringt und, das Plasma der Zelle durchziehend, am Vorderende austritt. Der Kern ist wesentlich dichter als bei *M. varians*, wo er einem Chromozentrenkern ähnelt. Er besitzt ein schwächer tingiertes Inneres und eine dünne, stellenweise verdickte, intensiv gefärbte Rinde. Weitere Erhöhung des Kondensationsgrades der Spermakerne wurde früher bei *Biddulphia*-Arten beobachtet (v. STOSCH 1956). Jetzt zeigt sich, daß er schon innerhalb der Gattung verschieden weit getrieben sein kann.

Abschließend sei auf die weite Verbreitung dieses Typus der Spermatogenese bei Discaceen hingewiesen. Bei einiger Variation im Ergebnis der prämeiotischen Differenzierungsteilungen fanden wir grundsätzlich gleichartigen Verlauf der Meiosis selbst bei *Stephanopyxis*, 2 kleineren *Coscinodiscus*-Arten, bei *Actinoptychus* und *Actinocyclus*. Über sie soll später berichtet werden.

Summary

Groups of 8, 16 or possibly more simplified spermatogonia, poor in plastids, originate from vegetative cells of the monoecious centric Diatom *Melosira moniliformis* by specialized mitoses and enter meiosis. The first nuclear division of the latter gives rise to a binucleate plasmodium. The daughter nuclei of the second division, surrounded by the



Abb. 5. Spermien von *M. moniliformis*. Punctiert rechts: Vegetativer Kern mit Nucleolus in Profilstellung, locker euchromatisch; aus dem gleichen Präparat

prospective spermal plasm, are pushed off from the main part of cytoplasm, which retains all plastids and the vacuole, by means of a „Stemmkörper“. In interphase, the flagella grow out in pairs near the nuclei. Their bases separate and migrate towards the poles of the spindle. The four spermia, consequently, are uniflagellate and colourless.

Die Untersuchungen wurden durch Sach- und Reisemittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt, für die ich meinen Dank sage, ebenso wie für die Gastfreundschaft meiner Kollegen in List. Herrn stud. phil. G. KALDEN danke ich für seine Hilfe bei der Anfertigung von Zeichnungen.

Literatur

v. Stosch, H. A.: Arch. Mikrobiol. **16**, 101 (1951). — Züchter **22**, 269 (1952). — VIII. Congr. Int. Bot., Rap. Com. Sect. **17**, 58 (1954a). — Protoplasma (Wien) **44**, 365 (1954b). — Arch. Mikrobiol. **23**, 327 (1956).

(From the Microbiological and Enzyme Chemistry Research Unit, National Research Centre Cairo)

The influence of Zinc, Copper, Iron and Manganese on the Mycological Production of Citric acid in surface cultures*

By

EZZ EL-DIN M. TAHA and TAHANI A. EL-ZEINI

With 4 Figures in the text

(Eingegangen am 11. August 1958)

The literature contains seemingly contradictory reports regarding the influence of trace or micro elements on the microbiological production of citric acid [PERQUIN (1938), FOSTER (1939), von LOESECKE (1945), PERLMAN (1946a), UNDERKOFFLER and HICKEY (1954)].

This controversy between the results obtained by different investigators may be partly attributed to the fact that those investigators had used different fungal strains. FOSTER (1949) is also of this opinion and reported that different strains of citric acid forming fungi react differently towards the trace elements i.e. a given level of certain element may enhance citric acid formation in certain fungal strain and depress it in another strain. "The strain specificity of citric acid forming fungi is therefore exceedingly striking in connection with trace elements."

RAULIN (1869) had, however found that zinc and iron are essential for the fungal growth. This conclusion was also confirmed by BERTRAND et al. (1911) and STEINBERG (1919). The latter author further reported in 1935 that manganese is also required. BORTELS (1927) was the first to indicate the essentiality of copper. WOLF et al. (1930) also confirmed such result.

Many investigators studied the influence of these four previously mentioned elements namely zinc, iron, copper and manganese on the citric acid production by fungi.

PORGES (1932) found that addition of Iron increased the yield of citric acid. CHRASZCZ and PEYROS (1935) also found that iron favoured the acid production. They also found that there is a great difference between their experimental strains with regard to the effect of iron. GIORDANI (1935), on the other hand, found that iron reduced the citric acid yield. PERLMAN et al. (1946) demonstrated that partial removal of the iron deficiency from their medium increased the acid yield. SHU and JOHNSON (1947—1948) had also shown that certain concentrations of iron and zinc are optimum for obtaining high yields of the acid. TOMLINSON et al. (1950) also showed that the presence of iron is essential for maximum citric acid production.

As far as zinc is concerned CHRASZCZ and PEYROS (1935) found that addition of zinc reduced the yield. Similar conclusion was drawn by BERNHAUER (1941) and PERLMAN (1946). TOMLINSON (1950) on the other hand, found that zinc is necessary for maximal citric acid production.

* A Greeting to the 70th Birthday of Prof. Dr. A. RIPPEL-BALDES.

PORGES (1932) reported, however, that manganese and copper are inhibitory to the acid production. Manganese was also found to be inhibitory by SHU and JOHNSON (1946). BERNHAUER et al. (1941) demonstrated that while manganese salts had no constant effect, copper had an inhibitory action. TOMLINSON (1950) found, however, that the addition of very small amounts of manganese or copper or both permitted higher yields of citric acid. Similar results as regard manganese were previously obtained by PERLMAN et al. (1946).

Several studies were also carried out on the influence of these previously mentioned trace elements in combination i.e. two or more elements at the same time [e.g. PERLMAN (1946), TOMLINSON (1950)].

From this short review it can be obviously seen that the results obtained by different investigators regarding the influence of micro- or trace-elements on citric acid production is quite conflicting. It was therefore rather of interest to investigate the influence of the trace elements, namely iron, copper, zinc and manganese on citric acid production by a strain of *Aspergillus niger* isolated from Egyptian soil and proved to be a good citric acid producer (TAHA et al. 1957).

Methods

Jena glass 300 ccm Erlenmeyer flasks were thoroughly filled with concentrated hydrochloric acid and then left for twenty four hours after which they were completely washed with tap, distilled and finally with bidistilled water.

Synthetic fermentation medium of the following composition: sucrose 150 gm., NH_4NO_3 2 gm., KH_2PO_4 1 gm., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 gm./l. was prepared.

Analytical reagent grade chemical ingredients were used. The prepared medium was dispersed in 50ccm portions into the experimental flasks. The flasks were divided into 4 lots: Different concentrations of zinc sulphate were added to the flasks of the first lot; three flasks were, however, used for each particular concentration. To the flasks of the second lot different concentrations of copper sulphate were similarly added. Different concentrations of ferric chloride and manganese chloride were added to the flasks of the third and fourth lot respectively. It was also taken into consideration that the volume and dilution of the medium in all the experimental flasks were the same. Five flasks of the original medium without any additions of trace elements served as control. The fermentation medium in the flasks was adjusted to pH 2 and inoculated with equal volumes of spore suspension, taken from 10 days old culture of *Aspergillus niger* 571 strain. After 10 days incubation at 30° C. the different quantitative determinations were carried out. The total titrable acidity was determined by titration of 2ccm aliquots of the culture medium with 0.1 N NaOH using phenolphthalein as indicator.

Citric acid was determined colorimetrically according to the method previously used by PERLMAN et al. (1944).

The original and residual sugar were estimated according to the LANE and EYNON volumetric method.

Results and comment

The influence of addition of different levels of each of the four trace elements on the production of citric acid by the experimental strain of *Aspergillus niger* is illustrated graphically in Figs. 1—4. From the data given the following results could be derived.

A. The influence of Zinc (Fig. 1)

The amounts of citric acid produced are actually influenced by the addition of zinc to the fermentation medium. At the lowest experimental concentration (0.002 mg./l.) no appreciable influence of zinc addition was observed on the acid production; the amount of the acid produced as well as the yield at this concentration was more or less similar to those obtained at the control experiment without any addition of zinc. As the concentration of zinc increased the acid production also increased till it reached a maximum at a concentration of about 0.1 mg./l., above

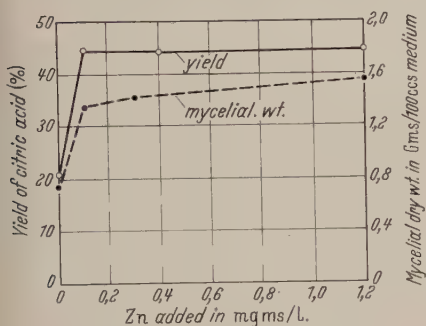


Fig. 1

Fig. 1. The influence of the addition of different concentrations of zinc (as zinc sulphate) to the fermentation medium on the fungal growth and the acid yield in the citric acid fermentation by *Aspergillus niger* 571

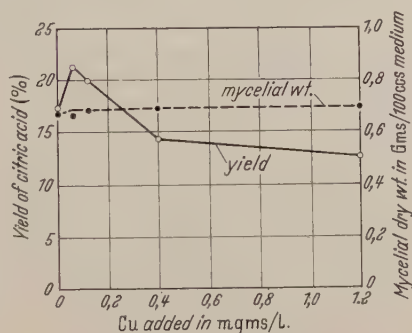


Fig. 2

Fig. 2. The influence of the addition of different copper concentrations (as copper sulphate) to the fermentation medium on the fungal growth and acid yield in the citric acid fermentation by *Aspergillus niger* 571

which further increase in zinc concentration was not accompanied by any significant variation in the citric acid production. It was also noticed that the addition of zinc to the synthetic medium did not only favour citric acid production but also stimulated better growth. As the zinc concentration increased the mycelial dry weight also showed an increase till it reached about double that of the control at a concentration of about 0.4 mg./l.

From the previously mentioned results it could be concluded that the addition of zinc to the pure synthetic medium in concentrations ranging from 0.1—1 mg./l. stimulated better citric acid production.

B. Influence of copper (Fig. 2)

It seems that the yield of the acid was not appreciably influenced by the addition of copper in concentrations ranging from 0.01—0.1 mgm./l., further increase in concentrations of copper added caused a depression in the acid yield. At a concentration of 10 mg./l. the acid yield amounted

only to $\frac{1}{4}$ of that of the control. Copper additions in concentrations of 0.01—1 mg./l. seem to have a slight inhibitory effect on growth. At the highest experimental concentration (10 mg./l.) the growth was strongly inhibited and the mycelial dry weight amounted only to half of that of the control. It is generally concluded therefore that the addition of copper did not prove to have any stimulatory effect on the acid production.

C. Influence of manganese (Fig. 3)

The addition of manganese even in traces had an inhibitory effect on the acid production. The addition of manganese in a concentration as

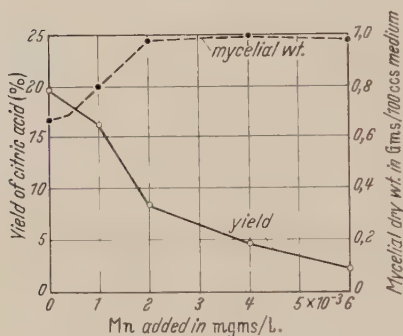


Fig. 3

Fig. 3. The influence of addition of different concentrations of manganese (as MnCl_2) to the fermentation medium on the fungal growth and the acid yield in the citric acid fermentation by *Aspergillus niger* 571

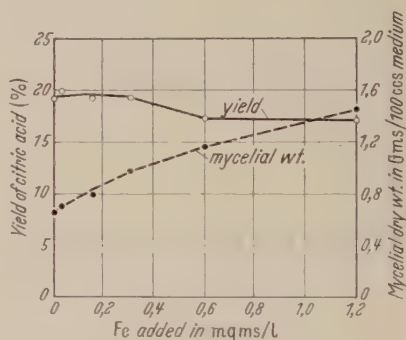


Fig. 4

Fig. 4. The influence of addition of different concentrations of iron (as iron chloride) to the fermentation medium on the fungal growth and the acid yield in the citric acid fermentation by *Aspergillus niger* 571

low as 0.0005 mgm./l. reduced the yield to about 90% of that of the control. As the concentration of manganese added increased, the inhibitory action also increased and the yield at the highest experimental concentration amounted only to about 12% of that of the control.

D. Influence of iron (Fig. 4)

The addition of iron to the fermentation medium in amounts ranging from 0.025—0.3 mg./l. had no appreciable influence on the citric acid yield. The amounts of the acid produced at the experimental concentrations of this range was more or less similar to that of the control. As the iron concentration further increased the yield of the acid slightly decreased and the maximum decrease obtained at the highest experimental concentration amounted to about 20% of the yield of the control experiment.

Discussion

The experimental results presented indicate that the addition of zinc to the synthetic fermentation medium stimulated better citric acid production. Certain concentration of zinc was found to be optimum for obtaining high yields of the acid. The original basal medium seems not to contain the necessary amounts of zinc required for establishing best acid production. The calculated amounts of zinc present as impurities accompanying the analytical reagent salts composing the medium—as shown on the labels of the manufacturer—amounted to about 0.0125 mg./l.

The experiments carried out also evidenced that addition of copper in amounts ranging from a 0.01—1 mg./l. showed a slight inhibitory effect on the acid production. Additions of iron in amounts ranging from 0.025—0.3 mg./l. proved to have no appreciable influence on the acid yield. It is assumed that additions of these two previously mentioned elements is not therefore essential for better yields of the acid. It is also supposed that the necessary requirements of iron was presumably provided by impurities already present in the basal medium. Analytical reagent chemicals used in the preparation of this medium contained—as the manufacturers labels indicate—the following percentages of iron as maximum: sugar 0.0002%, ammonium nitrate 0.0002%, Magnesium sulphate 0.0001%, potassium phosphate 0.0001%. These figures gave the probability of the presence of about 0.3 mg./l iron in the basal medium.

Additions of manganese even in small amounts was always accompanied by an inhibitory action on the acid production.

The high yields obtained in our previous experiments (TAHA et al. 1957) using synthetic media, the salt components of which were pure grade, without any addition of trace elements may be attributed to the unrecognized effect of the impurities—especially zinc and iron—presumably present in those chemicals.

Summary

When analytical reagent grade chemicals were used in the preparation of the fermentation medium for citric acid production, enrichment with zinc was found to be essential for establishing good acid production addition of manganese on the other hand, was found to be inhibitory. Slight inhibition or no effect was obtained on addition of copper and iron respectively.

Literatur

- BERNHAEUER, K.: *Biochem. Z.* **309**, 151 (1941). — BERTRAND, G., and M. JAVILLIER: *Compt. rend.* **152**, 225 (1911). — BORTELS, H.: *Biochem. Z.* **182**, 301 (1927).
 CHRASZCZ, T., and E. PEYROS: *Biochem. Z.* **280**, 325 (1935).
 FORSTER, J. W.: *Botan. Review.* **5**, 207 (1939). — Chemical activity of fungi. New York: Academic Press 1949.

GIORDANI, M.: *Chim. industria (Milan)* **17**, 77 (1935).

LANE, J., and L. EYNON: *J. Soc. chem. Ind. (Lond.)* **26**, 32 (1923). — LOESECKE, H. W. VON: *Chem. Eng. News* **23**, 1952 (1945).

PERLMAN, D., H. A. LARDY and M. J. JOHNSON: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **16**, 515 (1944). — PERQUIN, L. H. C.: Dissertation Delft cited in industrial fermentation by I. UNDERKOFER et al. 1954. — PORGES, N.: *Amer. J. Bot.* **19**, 559 (1932).

RAULIN, J.: *Ann. des Sci. natur.* **11**, 93 (1869).

SHU, P., and M. J. JOHNSON: *J. Bacter.* **54**, 161 (1947). — *Ind. Eng. Chem.* **40**, 1202 (1948). — STEINBERG, R. A.: a) *Amer. J. Bot.* **6**, 330 (1919). — b) *Bull. Torrey bot. Club.* **46**, 1 (1919).

TAHA, E. D., and T. ELZEINI: *Proceedings of the science Arab Congress* 1957. — TOMLINSON, N., J. J. R. CAMPBELL and P. C. RUSSEL: *J. Bacter.* **59**, 217 (1950).

UNDERKOFER, I., and R. HICKEY: *Industrial fermentation* New York 1954.

WOLFF, L. K., and A. EMMERIE: *Biochem. Z.* **228**, 441 (1930).

(Aus dem Laboratorium voor Microbiologie, Technische Hogeschool, Delft, und dem Institut für landw. Bakteriologie und Gärungsbiologie, Eidg. Techn. Hochschule, Zürich)

Über die Wechselwirkung der Wuchsstoffe meso-Inosit, (+)-Biotin, D(+)-Pantothensäure, β -Alanin und D(-)-Pantoinsäure bei der Kulturweihefe „Dézaley“ (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) *

Von
T. WIKÉN und CL. AGTHE **

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. April 1958)

Die Kulturweihefe „Dézaley“, welche sich als ein Stamm der Art *Saccharomyces cerevisiae* Hansen erwiesen hat, ist auxo-heterotroph und kann in synthetischen Nährlösungen, die Ammonsulfat oder Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle enthalten, erst durch Zusatz eines Gemisches der drei Wuchsstoffe (+)-Biotin, meso-Inosit und D(+)-Pantothensäure zur maximalen Vermehrung gebracht werden. In den mit Caseinhydrolysat angesetzten Kulturen übt Biotin allein über angemessene Bebrütungszeiten keinen fördernden Einfluß auf das Wachstum dieser Heferasse aus, während nach Zusatz von meso-Inosit allein eine verhältnismäßig langsame Zellvermehrung sofort nach der Impfung einsetzt. In angemessenen Zeitspannen führt diese Vermehrung nur zu einer relativ kleinen Höchstaubeute an Zellen. In gleichzeitiger Anwesenheit der beiden Vitamine läßt sich bei der „Dézaley“-Hefe eine Interferenz von antagonistischer Natur nachweisen, indem der erwähnte Wuchsstoffeffekt des meso-Inosits über gewisse Zeitspannen durch Biotin stark gehemmt wird. In quantitativer Hinsicht (Zellenzahl beim Einsetzen des antagonistischen Effekts, Dauer der Hemmungsphase) ist diese Interferenz u. a. von der zur Impfung der Kulturen verwendeten Zellmenge abhängig. Die in Anwesenheit von 25 γ (+)-Biotin und 25 mg meso-Inosit pro 1000 ml Substrat über 72—500 Std dauernde Wachstumshemmung wird durch Zusatz von 2,5 mg Ca-Pantothenat (2,3 mg D(+)-Pantothensäure) aufgehoben (WIKÉN u. RICHARD 1951 b u. 1952).

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

** Ständige Adresse: Weltgesundheitsorganisation, Palais des Nations, Genève.

RYAN, KUNIN u. BALLENTINE (1953) haben einen hemmenden Effekt des (+)-Biotins bei einer Mutante von *Neurospora crassa* beschrieben. Das Wachstum dieser Mutante wurde durch Biotin in verhältnismäßig hohen Konzentrationen, welche immerhin für den wilden *Neurospora*-Stamm noch optimal waren, vollständig oder zum Teil gehemmt. Diese Hemmung konnte durch Erhöhung der Pantothenensäure-Konzentration beseitigt werden. Die in Gegenwart von 4 γ Biotin und 191 γ Ca-Pantothenat pro 1000 ml Substrat hervorgerufene vollständige Wachstums- hemmung war nach Erhöhung der Konzentration des Ca-Pantothenats auf 245 bzw. 294 γ pro 1000 ml noch bemerkbar und wurde erst durch Zusatz von 441 γ dieses Vitamins pro 1000 ml vollständig aufgehoben.

Die Wuchsstoffwirkung der D(+)-Pantothenensäure bei Hefen, u. a. bei Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, wurde bekanntlich durch die Arbeiten von WILLIAMS u. BRADWAY (1931), WILLIAMS u. TRUESDAIL (1931) sowie WILLIAMS, LYMAN, GOODYEAR, TRUESDAIL u. HOLADAY (1933) festgestellt. Durch die Untersuchungen von WILLIAMS u. ROHRMAN (1936) sowie WEINSTOCK, MITCHELL, PRATT u. WILLIAMS (1939) wurde sodann nachgewiesen, daß β -Alanin ein Bestandteil der Pantothenensäure ist und gleich wie diese bei gewissen Hefen als Wuchsstoff dienen kann. MUELLER u. KLOTZ (1938) konnten zeigen, daß dies auch bei einem Stamm von *Corynebacterium diphtheriae* der Fall ist. Schließlich gelang es UNDERKOFER, BANTZ u. PETERSON (1943) sowie SARETT u. CHELDELIN (1945) festzustellen, daß D(—)-Pantoinsäure, d. h. der zweite Bestandteil der Pantothenensäure oder D(—)- α -Oxy- β , β -dimethyl- γ -butyrolacton (α , γ -Dioxy- β , β -dimethyl-buttersäure), bei einem Stamm von *Acetobacter suboxydans* gleich wie Pantothenensäure Wuchsstoff- wirkung ausübt, während sich β -Alanin bei diesem Organismus als unwirksam er- wies.

Aus den hier in aller Kürze erwähnten Resultaten geht als wahrschein- lich hervor, daß gewisse Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* und *Corynebacterium diphtheriae* in Anwesenheit des β -Alanins zur Synthese von Pantoinsäure befähigt sind, während bestimmte Stämme von *Acetobacter suboxydans* in Gegenwart der Pantoinsäure β -Alanin zu synthetisieren vermögen.

Nach HARTELIUS u. JOHANSEN (1946) wird bei gewissen Hefestämmen in Anwesenheit suboptimaler Mengen des β -Alanins und der Pantothen- säure durch Zusatz von Pantoinsäure im Überfluß eine kräftige Wachs- tumsförderung bewirkt. In der Tat konnte sogar in Gegenwart optimaler Mengen der beiden Wuchsstoffe eine günstige Wirkung der Pantoinsäure auf die Hefevermehrung nachgewiesen werden. KING u. CHELDELIN (1948) wiederum konnten in Anwesenheit von Pantothenensäure gar keinen fördernden Einfluß der Pantoinsäure auf das Wachstum eines Stammes von *Saccharomyces carlsbergensis* feststellen. In Gegenwart suboptimaler bzw. optimaler Quantitäten des β -Alanins fanden sie nach Zusatz von Pantoinsäure nur eine leichte bzw. keine Wachstums- förderung. Durch Zusatz dieser Substanz im Überfluß wurde die Hefe- vermehrung gehemmt.

Im Hinblick auf die obigen Tatsachen schien es uns von Interesse, den antagonistischen Effekt des (+)-Biotins gegen meso-Inosit bei der Heferasse „Dézaley“ näher zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse einer Prüfung der hemmungsaufhebenden Wirkung der D(+)-Pantothensäure, des β -Alanins und der D(—)-Pantoinsäure beschrieben. Dabei wird selbstverständlich auch die Rolle der beiden letzten Verbindungen als Wuchsstoffe, wenn sie einzeln oder in Gemischen zum Substrat gesetzt werden, berücksichtigt.

Methodik

Bezüglich der bei den Untersuchungen verwendeten Methodik verweisen wir auf die Arbeiten von WIKÉN u. RICHARD (1951 a u. b, 1952) sowie WIKÉN, SOMM u. SULZER (1954). Hier sei nur erwähnt, daß in sämtlichen Versuchen die Nährlösung C als Substrat zur Verwendung kam. Diese enthält vitaminfreies Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle und Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle.

In den Tab. 1—5 und Abb. 1—4 sind als Maß des Hefewachstums die Durchlässigkeitswerte ($\%$) der Kulturen für Licht der Wellenlänge 660 m μ angegeben, wobei sämtliche Werte Durchschnitte aus 5 parallelen Kulturen darstellen. In den Tab. 1—5 sind ferner die Extremwerte der durchschnittlichen Abweichungen (δ) für jede Wachstumsreihe aufgeführt.

Versuchsergebnisse und Diskussion

Im ersten Versuch sollte geklärt werden, ob bei der Heferasse „Dézaley“ D(+)-Pantothensäure durch β -Alanin ersetzt werden kann. Geprüft wurden äquimolare Mengen der beiden Wuchsstoffe und zwar 2,5 mg Ca-Pantothemat (2,3 mg Pantothensäure) und 0,93 mg β -Alanin pro 1000 ml Substrat. Aus Tab. 1 geht hervor, daß die durch (+)-Biotin in den Inosit-haltigen Kulturen hervorgerufene Wachstumshemmung über eine Zeitspanne von 120 Std dauert und von β -Alanin gleich wie von Pantothensäure aufgehoben wird. In dem mit β -Alanin allein versetzten Substrat verläuft die Zellvermehrung eher rascher als in der Nährlösung, welche nur Pantothensäure enthält.

Im zweiten Versuch beabsichtigten wir festzustellen, ob β -Alanin wirksam ist, wenn es nach der Impfung der Kulturen im Laufe der Hemmungsphase zugesetzt wird. Dabei kamen zwei verschiedene Impfmengen im Verhältnis 1 : 0,5 zur Verwendung. In einer Versuchsreihe wurde β -Alanin wie üblich vor der Impfung, in einer zweiten Reihe erst 78 Std nach der Impfung zugesetzt. In beiden Fällen betrug seine Anfangskonzentration 0,93 mg/1000 ml Substrat. Aus Tab. 2 ist ersichtlich, daß die Wachstumshemmung in den Kulturen, welche ein Gemisch von meso-Inosit und (+)-Biotin enthalten, über 144 bzw. 144—168 Std dauert. Sie wird durch β -Alanin aufgehoben und zwar unabhängig davon, ob der Zusatz dieser Aminosäure vor der Impfung oder erst im Laufe

der Hemmungsphase erfolgt. Die durchschnittliche Vermehrungsgeschwindigkeit der Hefezellen ist aber beim nachträglichen Beimischen des β -Alanins wesentlich kleiner, als wenn die Aminosäure bereits beim Impfen im Kultursubstrat vorhanden ist. Die Durchlässigkeit der Kulturen für Licht der Wellenlänge 660 $m\mu$ betrug unmittelbar nach der Impfung 96,9 bzw. 98,6%, je nachdem die große oder kleine Impfmenge zur Verwendung kam. Zur Zeit der nachträglichen Zugabe des β -Alanins,

Tabelle 1. Wachstum der „Dézaley“-Hefe in Nährlösung C. Aufhebung des Antagonismus des (+)-Biotins gegen meso-Inosit durch Zusatz von D(+)-Pantothensäure bzw. β -Alanin vor der Impfung der Substrate

Zeit Std	Kein Wachstoffsatz	(+) Biotin 25 γ /1000 ml	meso-Inosit 25 mg/1000 ml	D(+)-Pantothensäure 2,3 mg/1000 ml	β -Alanin 0,93 mg/1000 ml	(+) Biotin 25 γ /1000 ml			
						meso-Inosit 25 mg/1000 ml	β -Alanin 0,93 mg/1000 ml	meso-Inosit 25 mg/1000 ml	
								D(+)-Pantothensäure 2,3 mg/1000 ml	β -Alanin 0,93 mg/1000 ml
	M	M	M	M	M	M	M	M	M
24	94,5	94,8	86,7	95,7	94,0	87,9	94,2	80,1	79,5
48	92,4	91,8	79,4	89,4	86,4	88,3	83,2	18,3	18,9
72	93,8	91,5	84,2	85,0	79,3	88,1	70,6	7,2	7,0
96	—	—	81,9	—	—	88,8	—	—	—
120	92,3	90,7	79,3	76,5	76,4	88,3	49,1	5,9	6,0
168	90,0	91,4	73,9	72,1	67,2	67,8	28,6	5,3	5,4
216	89,1	86,5	66,3	68,8	66,1	43,7	17,1	7,0	5,7
	$\delta \begin{Bmatrix} 0,56 \\ 2,62 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 1,06 \\ 2,64 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,92 \\ 3,04 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,74 \\ 2,86 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,64 \\ 3,16 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,86 \\ 3,12 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,36 \\ 2,72 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,14 \\ 1,76 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,38 \\ 1,36 \end{Bmatrix}$

d. h. 78 Std nach der Impfung, war sie in den Kulturen mit dem Biotin-Inosit-Gemisch auf ca. 80 bzw. 86% gesunken, was auf eine 5—7fache bzw. 6—8fache Vermehrung der Hefe schließen läßt. Da die pro Volumeneinheit der Kulturflüssigkeit zugesetzte β -Alanin-Menge in den betreffenden Versuchsreihen gleich groß war (0,93 mg/1000 ml), stand beim nachträglichen Beimischen eine wesentlich kleinere Quantität dieser Aminosäure pro Hefezelle zur Verfügung als beim Zusatz vor der Impfung. Der oben erwähnte Unterschied in der Vermehrungsgeschwindigkeit ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß ihre Abnahme, welche infolge der Verminderung der pro Hefezelle wirkenden β -Alanin-Menge eintritt, nicht durch die erhöhte Zellenzahl kompensiert

werden kann. Es ist aber auch möglich, daß die Zahl der vermehrungsfähigen Zellen im Laufe der Hemmungsphase so stark reduziert wird, daß sie kleiner ist als in der ursprünglichen Impfmenge.

Tabelle 2. Wachstum der „Dézaley“-Hefe in Nährlösung C. Aufhebung des Antagonismus des (+)-Biotins gegen meso-Inosit durch Zusatz von β -Alanin vor bzw. 78 Std nach der Impfung der Substrate

Zeit Std	(+) Biotin 25 γ /1000 ml	meso-Inosit 25 mg/1000 ml	β -Alanin 0,93 mg/1000 ml	(+) Biotin 25 γ /1000 ml meso-Inosit 25 mg/1000 ml		
				Kein Zusatz von β -Alanin	β -Alanin 0,93 mg/1000 ml	
					Zusatz vor der Impfung	Zusatz 78 Std nach der Impfung
M	M	M	M	M	M	M

Impfmenge: 1

24	92,6	75,4	89,7	79,3	62,6	—
48	87,8	58,1	72,4	78,9	13,4	—
72	87,1	49,2	66,9	80,6	6,0	—
96	88,1	46,8	62,8	78,4	5,4	76,0
120	83,1	44,1	58,4	74,8	5,5	32,9
144	85,7	45,1	53,2	60,2	5,8	12,8
168	86,5	39,9	54,3	39,7	5,7	6,7
192	85,6	34,2	53,9	24,5	5,8	6,7
	$\delta \begin{cases} 0,80 \\ 1,64 \end{cases}$	$\delta \begin{cases} 1,52 \\ 3,68 \end{cases}$	$\delta \begin{cases} 0,22 \\ 2,94 \end{cases}$	$\delta \begin{cases} 1,26 \\ 3,68 \end{cases}$	$\delta \begin{cases} 0,04 \\ 0,69 \end{cases}$	$\delta \begin{cases} 0,26 \\ 2,44 \end{cases}$

Impfmenge: 0,5

24	95,3	86,1	92,2	87,6	72,2	—
48	92,1	79,5	78,9	85,3	14,9	—
72	90,9	81,6	76,1	86,1	8,0	—
96	90,5	75,2	69,4	87,0	6,3	89,7
120	90,2	71,8	66,6	86,7	6,0	78,3
144	90,2	77,0	65,1	86,3	6,4	31,6
168	90,3	73,2	61,9	75,8	6,5	11,0
192	90,6	73,5	65,2	61,7	5,5	6,5
	$\delta \begin{cases} 0,42 \\ 1,44 \end{cases}$	$\delta \begin{cases} 1,02 \\ 3,46 \end{cases}$	$\delta \begin{cases} 1,24 \\ 2,20 \end{cases}$	$\delta \begin{cases} 0,96 \\ 1,88 \end{cases}$	$\delta \begin{cases} 0,16 \\ 1,30 \end{cases}$	$\delta \begin{cases} 0,56 \\ 1,98 \end{cases}$

Im dritten Versuch wurde die Wuchsstoffwirkung der D(—)-Pantoin-säure geprüft. Es kamen äquimolare Mengen der D(+)-Pantotheinsäure, des β -Alanins und der D(—)-Pantoinsäure zur Verwendung (2,3 bzw. 0,93 und 1,37 mg/1000 ml). Die in Tab.3 aufgeführten Daten zeigen, daß

Tabelle 3. Wachstum der „Dézaley“-Hefe in Nährlösung C. Aufhebung des Antagonismus des (+)-Biotins gegen meso-Inosit durch Zusatz von D(+)-Pantothensäure bzw. β -Alanin oder D(—)-Pantothensäure sowie Gemischen der beiden letzten Wachstoffsstoffe vor der Impfung der Substrate

Zeit Std	Kein Wachstoffsstoffzusatz		(+) - Biotin 25 γ /1000 ml		meso-Inosit 25 mg/1000 ml		D(+)-Pantothensäure 2,3 mg/1000 ml		β -Alanin 0,93 mg/1000 ml		D(—)-Pantothensäure 1,37 mg/1000 ml		β -Alanin 0,93 mg/1000 ml		D(—)-Pantothensäure 1,37 mg/1000 ml	
	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
24	90,4	91,6	75,8	89,0	86,3	89,6	79,3	62,0	61,5	78,0	63,0	85,9				
48	87,1	86,9	58,0	81,5	77,9	85,8	76,9	18,4	18,1	72,3	18,8	74,6				
72	82,0	88,7	53,7	78,7	72,1	83,5	82,7	6,3	7,6	75,7	6,7	66,6				
96	83,3	87,6	49,3	75,4	68,5	79,5	81,0	5,9	5,6	74,7	5,6	62,4				
120	72,6	87,2	43,8	73,0	60,4	78,4	70,5	5,1	4,9	52,7	5,1	52,0				
168	71,3	86,9	43,0	66,8	58,6	72,2	25,7	4,5	4,4	22,9	5,3	52,0				
	δ { 1,00 2,40 }	δ { 0,76 1,84 }	δ { 1,48 3,38 }	δ { 0,90 2,06 }	δ { 0,88 2,20 }	δ { 0,94 2,80 }	δ { 1,36 3,06 }	δ { 0,14 1,96 }	δ { 0,22 2,34 }	δ { 1,34 3,06 }	δ { 0,06 2,52 }	δ { 0,80 3,22 }				

der über eine Zeitspanne von 120 Std dauernde Antagonismus des Biotins gegen meso-Inosit nur in äußerst geringem Ausmaße durch Pantothensäure beseitigt werden kann, während er durch β -Alanin gleich wie durch Pantothensäure vollständig aufgehoben wird. Die Kombination von β -Alanin und Pantothensäure hat in Anwesenheit des Biotin-Inosit-Gemisches die gleiche Wirkung wie β -Alanin oder Pantothensäure allein. Dagegen konnte in den Kulturen, welche mit Biotin und meso-Inosit nicht versetzt waren, durch die erwähnte Kombination eine stärkere Wachstumsförderung erzielt werden als durch β -Alanin allein. Diese Aminosäure war ihrerseits wirksamer als Pantothensäure, während sich Pantothensäure als unwirksam erwies.

In einem vierten Versuch wurden sechs Konzentrationen der D(—)-Pantothensäure im Bereiche von 0,0137 bis zu 1365,0 mg pro 1000 ml Substrat geprüft, und zwar zum Teil mit, zum Teil ohne Zusatz des Biotin-Inosit-Gemisches. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 aufgeführt. Es ist ersichtlich, daß der Hemmungseffekt, der über 120 Std deutlich zum Vorschein kommt, in diesem Versuch durch Pantothensäure gar nicht oder höchstens zum äußerst geringen Teil gegen das Ende der Hemmungsphase aufgehoben wird. In den Kulturen, deren Substrate nur mit Pantothensäure versetzt worden waren, kann im Vergleich zu den Kulturen ohne Wuchsstoffzusatz oder mit Zugabe von Biotin allein eine schwache Wachstumsstimulierung nach 72 Std Bebrütung festgestellt werden.

Die in den oben beschriebenen Versuchen geprüften Konzentrationen der D(+)-Pantothensäure und des β -Alanins betrugen 2,3 mg bzw. 0,93 mg pro 1000 ml Substrat. Es schien uns nun von Interesse, die Wirkung kleinerer Mengen dieser Wuchsstoffe zu untersuchen. In einem fünften Versuch, dessen Resultate in Tab. 5 zusammengestellt sind, wurde die Nährlösung deshalb mit 230, 23 und 2,3 γ Pantothensäure bzw. äquimolaren Mengen des β -Alanins, d. h. 93,5, 9,35 und 0,935 γ pro 1000 ml versetzt. Im gleichen Versuch wurde die Vermehrung der Hefe in Gegenwart äquimolarer Quantitäten der D(—)-Pantothensäure, d. h. 137, 13,7 und 1,37 γ pro 1000 ml Substrat verfolgt. Ferner wurde die Wirkung der entsprechenden Gemische des letzten Wuchsstoffs mit β -Alanin geprüft. Aus Tab. 5 geht hervor, daß die über 72 Std dauernde Vermehrungshemmung in den Kulturen, welche gleichzeitig (+)-Biotin und meso-Inosit enthalten, sowohl durch Pantothensäure als auch durch β -Alanin aufgehoben wird, wobei die günstige Wirkung in beiden Fällen von der Konzentration abhängig ist. Im geprüften Bereich nimmt die Wachstumsförderung mit steigender Konzentration zu. Sie ist in den mit β -Alanin versetzten Kulturen wesentlich schwächer als in den entsprechenden Pantothensäure-haltigen Substraten. Die Kulturen, welche 93,5 γ des ersten bzw. 2,3 γ des letzten Wuchsstoffs pro 1000 ml

enthalten, zeigten approximativ die gleichen Vermehrungskurven. Auf molare Basis bezogen entsprechen 93,5 γ β -Alanin 250 γ Ca-Pantothenat (230 γ Pantothensäure), d. h. die „molare Wirkung“ des β -Alanins ist bei den erwähnten Konzentrationen nur ein Hundertstel derjenigen der Pantothensäure. Wir kommen auf dieses Verhältnis bei der Besprechung

Tabelle 4. Wachstum der „Dézaley“-Hefe in Nährlösung C. Aufhebung des Antagonismus des (+)-Biotins gegen meso-Inosit durch Zusatz von D(—)-Pantoinsäure in verschiedenen Konzentrationen vor der Impfung der Substrate

Zeit Std	Kein Wachstoffsatz	(+)-Biotin 25 γ /1000 ml	meso-Inosit 25 mg/1000 ml	(+) - Biotin 25 γ /1000 ml meso-Inosit 25 mg/1000 ml	D(—)-Pantoinsäure mg/1000 ml					
					0,0137	0,137	1,37	13,7	136,5	1365,0
	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

Kein weiterer Wachstoffsatz

24	89,2	89,4	71,9	77,4	91,2	90,2	88,0	88,3	89,9	85,7
48	85,9	85,5	52,3	73,3	88,1	86,5	82,5	84,4	85,3	83,8
72	83,7	88,4	47,8	76,2	81,8	80,3	80,4	80,1	81,7	79,6
96	80,6	87,2	45,9	74,6	74,3	74,9	73,5	73,9	81,3	80,2
120	78,6	86,8	39,7	53,9	75,0	72,2	72,3	74,7	74,1	71,8
168	75,6	81,7	39,8	18,3	62,9	62,7	64,6	68,9	71,8	66,8
	$\delta \begin{Bmatrix} 1,42 \\ 3,80 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 1,04 \\ 3,95 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 1,22 \\ 3,80 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,82 \\ 3,08 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,94 \\ 3,16 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 1,80 \\ 2,88 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 1,26 \\ 2,38 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,74 \\ 3,36 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,72 \\ 2,80 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,64 \\ 2,76 \end{Bmatrix}$

Zusatz eines Gemisches von (+)-Biotin und meso-Inosit:
25 γ /1000 ml bzw. 25 mg/1000 ml

24	—	—	—	—	72,4	75,0	74,9	73,8	77,4	74,5
48	—	—	—	—	75,4	72,3	76,0	75,8	76,2	71,4
72	—	—	—	—	70,4	75,7	78,9	76,8	77,9	75,0
96	—	—	—	—	71,8	71,5	74,5	71,6	76,2	72,9
120	—	—	—	—	39,4	40,0	43,2	40,4	48,3	61,6
168	—	—	—	—	16,4	17,1	17,3	16,0	15,4	17,8
					$\delta \begin{Bmatrix} 0,94 \\ 3,36 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 1,18 \\ 2,72 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,72 \\ 2,00 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,90 \\ 2,96 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 0,64 \\ 2,18 \end{Bmatrix}$	$\delta \begin{Bmatrix} 1,25 \\ 3,48 \end{Bmatrix}$

weiterer Versuche zurück. Aus Tab. 5 ist ferner ersichtlich, daß Pantoinsäure allein den Hemmungseffekt nicht aufheben kann und die Wirkung des β -Alanins nicht zu steigern vermag. In den Kulturen ohne Zugabe von Biotin und meso-Inosit wird durch β -Alanin allein sowie durch seine Kombination mit Pantoinsäure eine schwächere Wachstumsförderung hervorgerufen als durch Pantothensäure allein, während Pantoinsäure unwirksam ist.

Tabelle 5. Wachstum der „Dézaley“-Hefe in Nährlösung C. Aufhebung des Antagonismus des (+)-Biotins gegen meso-Inosit durch Zusatz von D(+)-Pantothensäure, β -Alanin oder D(—)-Pantothensäure sowie Gemischen der beiden letzten Wuchsstoffe in kleinen Konzentrationen vor der Impfung der Substrate

Zeit Std	Kein Wuchsstoffzusatz		meso-Inosit 25 mg/1000 ml		D(+)-Pantothensäure γ /1000 ml		β -Alanin γ /1000 ml		D(—)-Pantothensäure γ /1000 ml		β -Alanin γ /1000 ml	
	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
24	89,4	80,6	87,2	88,2	88,1	—	—	—	—	—	87,3	89,0
48	83,5	77,3	76,8	63,9	74,8	85,0	79,4	77,6	84,7	82,1	82,1	80,1
72	79,2	59,6	66,8	54,4	61,4	—	—	—	—	74,5	78,6	69,1
120	69,1	51,0	51,5	38,9	46,2	66,1	60,1	53,9	72,1	63,4	62,3	55,4
168	57,9	45,1	39,2	29,1	34,0	—	—	—	78,9	57,7	54,0	46,5
216	56,7	38,9	27,0	20,9	25,2	44,6	42,7	33,1	61,9	43,4	42,9	32,1
	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 1,14 \\ 3,58 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,74 \\ 3,04 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,88 \\ 2,58 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,92 \\ 2,94 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 1,06 \\ 3,28 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 1,62 \\ 2,98 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,96 \\ 2,36 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 1,64 \\ 3,30 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 1,18 \\ 3,24 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 1,18 \\ 3,78 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 1,50 \\ 3,24 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 1,82 \\ 3,04 \end{smallmatrix} \right.$
Zusatz eines Gemisches von (+)-Biotin und meso-Inosit: 25 γ /1000 ml bzw. 25 mg/1000 ml												
24	—	—	75,1	57,9	65,8	78,6	74,4	79,0	82,6	79,4	77,4	72,2
48	—	—	66,3	18,6	9,7	74,9	75,0	73,3	77,1	76,3	76,7	71,7
72	—	—	64,7	9,9	5,6	75,1	74,2	63,4	80,5	75,1	75,7	71,2
120	—	—	16,7	7,0	5,1	44,9	39,4	17,8	47,3	50,6	45,5	17,9
168	—	—	7,5	6,0	5,0	13,0	10,7	6,8	11,3	12,4	12,6	6,4
216	—	—	6,6	6,3	5,6	6,9	6,4	5,5	6,9	6,9	7,1	5,6
	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,32 \\ 2,58 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,23 \\ 2,08 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,18 \\ 3,34 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,16 \\ 3,16 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,23 \\ 2,42 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,16 \\ 3,72 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,25 \\ 2,72 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,15 \\ 3,35 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,60 \\ 3,32 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,56 \\ 3,04 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,28 \\ 1,93 \end{smallmatrix} \right.$	δ $\left\{ \begin{smallmatrix} 0,28 \\ 1,93 \end{smallmatrix} \right.$

Im sechsten Versuch beabsichtigten wir zu klären, ob die Inaktivität der D(—)-Pantoinsäure auf die von uns verwendete Sterilisationsmethode zurückzuführen sei. In den bereits beschriebenen Versuchen wurden die Substrate mit einer nicht sterilisierten Pantoinsäure-Lösung versetzt und sodann dreimal während 15—20 min gedämpft. Im sechsten Versuch wurde nun die Lösung dieses Wuchsstoffes gesondert durch Seitz-Filtern sterilisiert und der Nährlösung zum Teil vor, zum Teil nach dem Dämpfen zugegeben. Als Kontrollen dienten Kulturreihen, deren Substrate gemäß dem erwähnten Routineverfahren hergestellt worden waren. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, daß die Inaktivität oder äußerst geringe Aktivität der Pantoinsäure in unseren Wachstumsversuchen mit der Heferasse „Dézaley“ nicht auf eine Zerstörung der Substanz beim Dämpfen des Substrats zurückgeführt werden kann. Die Seitz-filtrierte Pantoinsäure-Lösung, welche der Nährlösung erst nach dem Dämpfen beigemischt wird, ist ebenfalls unwirksam. Auch im übrigen wurden die Ergebnisse der früheren Experimente durch die im sechsten Versuch gewonnenen Resultate durchwegs bestätigt.

In drei weiteren Versuchen (Nr. 7, 8 und 9) wurden die kleinsten Konzentrationen von D(+)-Pantothensäure und β -Alanin ermittelt, bei welchen die antagonistische Wirkung des (+)-Biotins (25 γ /1000 ml Substrat) gegen meso-Inosit (25 mg/1000 ml) aufgehoben wird. Die Zugabe der Pantothensäure und des β -Alanins erfolgte dabei *vor der Impfung*. Folgende Konzentrationen wurden geprüft:

Versuch 7: 2500, 250, 25 und 2,5 γ Ca-Pantothenat bzw. 935, 93,5, 9,35 und 0,935 γ β -Alanin pro 1000 ml Substrat.

Versuch 8: 250, 25, 2,5, 1,25, 0,75, 0,25 und 0,025 γ Ca-Pantothenat bzw. 935, 93,5, 9,35, 0,935 und 0,0935 γ β -Alanin pro 1000 ml Substrat.

Versuch 9: 0,25, 0,025, 0,0025 und 0,00025 γ Ca-Pantothenat bzw. 93,5 und 9,35 γ β -Alanin pro 1000 ml Substrat.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 1 (Versuch 7), 2 (Versuch 8) und 3 (Versuch 9) dargestellt und können wie folgt zusammengefaßt werden.

Aus Abb. 1 geht hervor, daß Pantothensäure in den Konzentrationen 2300, 230 und 23 γ /1000 ml (Kurven 6a, 6b und 6c) den Hemmungseffekt vollständig aufzuheben vermag, während sie in einer Menge von 2,3 γ /1000 ml (Kurve 6d) nur verhältnismäßig schwach wirksam ist. Nach Zusatz von 935 γ β -Alanin pro 1000 ml Substrat (Kurve 7a) wird der Antagonismus des Biotins gegen Inosit ebenfalls vollständig beseitigt. Dagegen wirkt dieser Wuchsstoff bei den Konzentrationen 93,5, 9,35 und 0,935 γ /1000 ml (Kurven 7b, 7c und 7d) gar nicht oder höchstens äußerst schwach. Auf molare Basis bezogen entsprechen 935 γ β -Alanin 2500 γ Ca-Pantothenat. Gleich wie in Versuch 5 (Tab. 5) ist

somit die „molare Wirkung“ der Pantothenensäure approximativ 100mal größer als diejenige des β -Alanins.

Abb. 2 zeigt, daß die in Biotin-Inosit-Kulturen auftretende Wachstumschemmung nach Zugabe von 230 bzw. 23 γ Pantothenensäure pro 1000 ml Nährlösung (Kurven 6b und 6c) vollständig eliminiert wird. In Anwesenheit von 2,3 bzw. 1,15, 0,70 und 0,23 γ Pantothenensäure pro

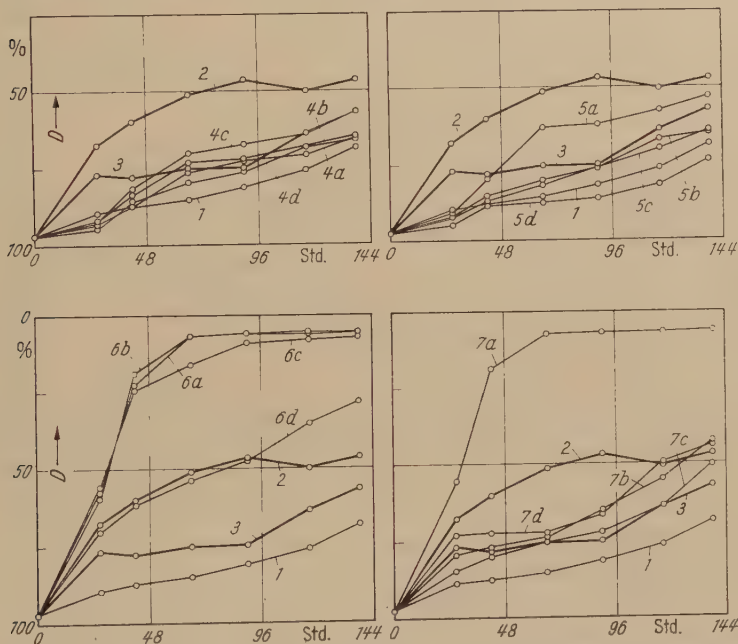


Abb. 1. Antagonismus des (+)-Biotins gegen meso-Inosit und seine Aufhebung durch D(+)-Pantothenensäure und β -Alanin. 1: 25 γ Biotin/1000 ml. 2: 25 mg Inosit/1000 ml. 3: 25 γ Biotin + 25 mg Inosit/1000 ml. 4a bzw. 4b, 4c und 4d: 2500 bzw. 250, 25 und 2,5 γ Ca-Pantothenat/1000 ml. 5a bzw. 5b, 5c und 5d: 935 bzw. 93,5, 9,35 und 0,935 γ β -Alanin/1000 ml. 6a bzw. 6b, 6c und 6d: 25 γ Biotin + 25 mg Inosit/1000 ml nebst 2500 bzw. 250, 25 und 2,5 γ Ca-Pantothenat/1000 ml. 7a bzw. 7b, 7c und 7d: 25 γ Biotin + 25 mg Inosit/1000 ml nebst 935 bzw. 93,5, 9,35 und 0,935 γ β -Alanin/1000 ml.

1000 ml wird der Antagonismus zum Teil aufgehoben, wobei die Wirkung bei der ersten Konzentration (Kurve 6d) mittelmäßig stark, bei den drei letzten Konzentrationen (Kurven 6e, 6f und 6g) nur sehr schwach ist. In einer Konzentration von 0,023 γ /1000 ml (Kurve 6h) ist die Pantothenensäure unwirksam. In Anwesenheit von 935 γ β -Alanin pro 1000 ml Nährlösung (Kurve 7a) läßt sich eine vollständige Beseitigung des Hemmungseffekts feststellen, während 93,5 γ dieses Wuchsstoffes pro 1000 ml (Kurve 7b) äußerst schwach wirken. Die Biotin-Inosit-Kulturen mit 9,35, 0,935 und 0,0935 γ β -Alanin pro 1000 ml (Kurven 7c, 7d und 7g)

zeigten keine Wachstumsförderung im Vergleich zu den entsprechenden Kulturen ohne β -Alanin-Zusatz (Kurve 3).

Aus Abb. 3 geht hervor, daß 0,23 γ Pantothenensäure pro 1000 ml Substrat (Kurve 6g) in den Biotin-Inosit-Kulturen eine äußerst schwache Wachstumsförderung hervorzurufen vermag, während 0,023, 0,0023 und 0,00023 γ des Vitamins (Kurven 6h, 6i und 6j) unwirksam sind. Es ist ferner ersichtlich, daß 93,5 γ β -Alanin pro 1000 ml Nährlösung (Kurve 7b)

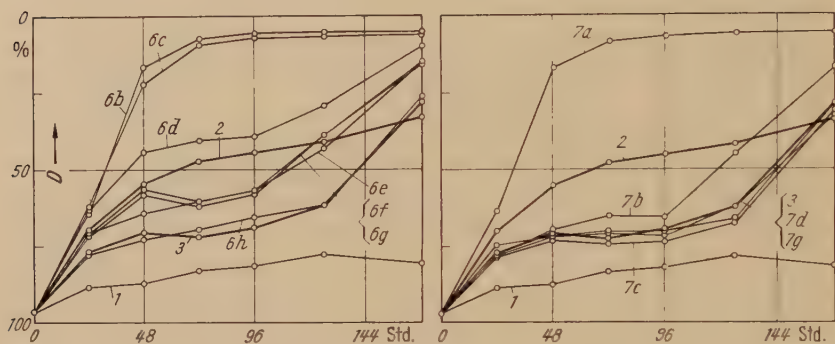


Abb. 2. Antagonismus des (+)-Biotins gegen meso-Inosit und seine Aufhebung durch D(+)-Pantothenensäure und β -Alanin. 1: 25 γ Biotin/1000 ml. 2: 25 mg Inosit/1000 ml. 3: 25 γ Biotin + 25 mg Inosit/1000 ml. 6b bzw. 6c, 6d, 6e, 6f, 6g und 6h: 25 γ Biotin + 25 mg Inosit/1000 ml nebst 250 bzw. 25, 2,5, 1,25, 0,75, 0,25 und 0,025 γ Ca-Pantothenat/1000 ml. 7a bzw. 7b, 7c, 7d und 7e: 25 γ Biotin + 25 mg Inosit/1000 ml nebst 935 bzw. 93,5, 9,35, 0,935 und 0,0935 γ β -Alanin/1000 ml

noch schwach stimulierend wirken, während 9,35 γ dieses Wuchsstoffes (Kurve 7c) praktisch inaktiv sind.

Die gut reproduzierbaren Ergebnisse der Versuche 7, 8 und 9 zeigen somit eindeutig, daß zur vollständigen Aufhebung der Wachstumshemmung, welche in C-Kulturen der Weinheferasse „Dézaley“ in gleichzeitiger Anwesenheit von 25 γ (+)-Biotin und 25 mg meso-Inosit pro 1000 ml Substrat regelmäßig eintritt, eine Zugabe von mindestens etwa 23 γ D(+)-Pantothenensäure oder 935 γ β -Alanin pro 1000 ml vor der Impfung der Kulturen nötig ist. Die aufhebende Wirkung der Pantothenensäure wird erst sichtbar im Konzentrationsbereich von 0,23—2,3 γ /1000 ml, während diejenige des β -Alanins im Bereiche von 9,35—93,5 γ /1000 ml einsetzt. Die „molaren Aktivitäten“ der beiden Wuchsstoffe verhalten sich sowohl bei der vollständigen Beseitigung des Antagonismus als auch beim Einsetzen der aufhebenden Tendenz wie 100 zu 1.

In einem zehnten Versuch sollten die Mindestkonzentrationen von D(+)-Pantothenensäure und β -Alanin ermittelt werden, welche beim Zusatz der Wuchsstoffe im Laufe der Hemmungsphase noch gerade wirksam sind. Als Kontrollen der Empfindlichkeit des zur Impfung verwendeten Zellmaterials gegen die betreffenden Wuchsstoffe dienten

Kulturreihen, deren Substrate bereits *vor dem Impfen* mit Pantothensäure und β -Alanin versetzt worden waren. Geprüft wurden folgende Konzentrationen: 25, 2,5, 0,25, 0,025 und 0,0025 γ Ca-Pantothanat bzw. 935, 93,5, 9,35, 0,935 und 0,0935 γ β -Alanin pro 1000 ml Nährlösung. Die Konzentrationen des (+)-Biotins bzw. des meso-Inosits betrugen durchwegs 25 γ bzw. 25 mg pro 1000 ml. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. In bezug auf die Aktivität der Pantothensäure und des

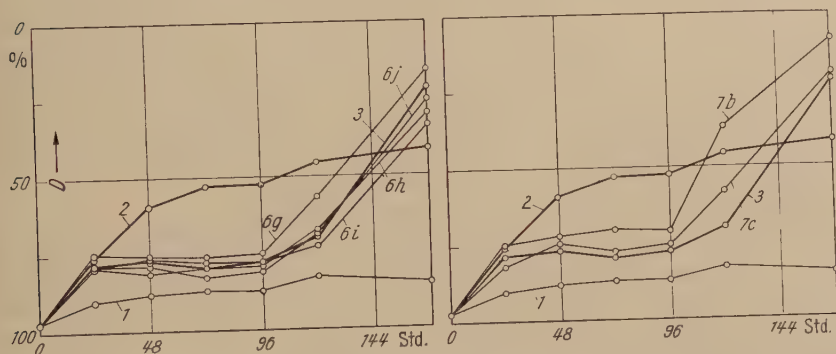


Abb. 3. Antagonismus des (+)-Biotins gegen meso-Inosit und seine Aufhebung durch D(+)-Pantothensäure und β -Alanin. 1: 25 γ Biotin/1000 ml. 2: 25 mg Inosit/1000 ml. 3: 25 γ Biotin + 25 mg Inosit/1000 ml. 6g bzw. 6h, 6i und 6j: 25 γ Biotin + 25 mg Inosit/1000 ml nebst 0,25 bzw. 0,025, 0,0025 und 0,00025 γ Ca-Pantothanat/1000 ml. 7b und 7c: 25 γ Biotin + 25 mg Inosit/1000 ml nebst 93,5 und 9,35 γ β -Alanin/1000 ml

β -Alanins bei Zugabe *vor der Impfung* bestätigen sie durchaus die Resultate der früheren Versuche. Die Hemmung wird durch 23 γ Pantothensäure (Kurve 6c) vollständig und durch 2,3 γ dieses Vitamins (Kurve 6d) nur zum Teil aufgehoben, während 0,23, 0,023 und 0,0023 γ (Kurven 6g, 6h und 6i) unwirksam sind. Sie läßt sich ferner durch 935 γ β -Alanin (Kurve 7a) vollständig und 93,5 γ des Wuchsstoffes (Kurve 7b) partiell beseitigen, während die Konzentrationen 9,35, 0,935 und 0,0935 γ /1000 ml (Kurven 7c, 7d und 7g) inaktiv sind. Beim *nachträglichen* Zusatz konnte eine hemmungsaufhebende Wirkung nur für 23 γ Pantothensäure (Kurve 6c) bzw. 935 γ β -Alanin (Kurve 7a) nachgewiesen werden. Die Wachstumsstimulierung, welche nach Zugabe von 2,3 γ des ersten (Kurve 6d) bzw. 93,5 γ des letzten Wuchsstoffes (Kurve 7b) einzusetzen scheint, ist zu gering, um als gesichert betrachtet zu werden (Vergleich mit Kurve 3). In Biotin-Inosit-Kulturen mit einer größeren Dauer der Hemmungsphase (vgl. WIKÉN u. RICHARD 1951 b u. 1952) hätte sich vielleicht auch bei diesen Konzentrationen eine fördernde Wirkung der Pantothensäure und des β -Alanins feststellen lassen. Aus Abb. 4 ist ferner ersichtlich, daß die Wachstumskurven im Falle eines nachträglichen Beimischens dieser beiden Vitamine eine Anpassungsphase („period of

cellular adjustment“ aufweisen (vgl. Tab. 2 u. 3). Beim Zusatz der gleichen Mengen Pantothensäure bzw. β -Alanin (23 bzw. 935 γ /1000 ml) vor der Impfung der Kulturen setzt die Vermehrung der Hefezellen dagegen praktisch ohne Induktionsperiode ein.

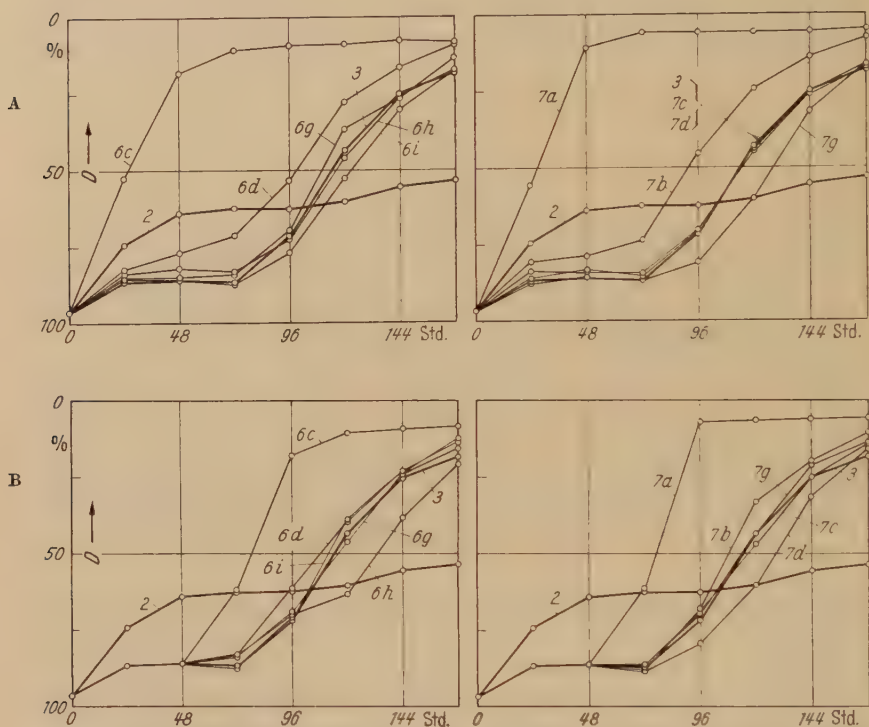


Abb. 4. Antagonismus des (+)-Biotins gegen meso-Inositol und seine Aufhebung durch D(+)-Pantothensäure und β -Alanin. A: Zusetzen der Pantothensäure bzw. des β -Alanins vor dem Impfen. B: Zusetzen der Pantothensäure bzw. des β -Alanins nach dem Impfen im Laufe der Hemmungsphase. 2: 25 mg Inositol/1000 ml. 3: 25 γ Biotin + 25 mg Inositol/1000 ml. 6c bzw. 6d, 6g, 6h und 6i: 25 γ Biotin + 25 mg Inositol/1000 ml nebst 25 bzw. 2,5, 0,25, 0,025 und 0,0025 γ Ca-Pantothensäure/1000 ml. 7a bzw. 7b, 7c, 7d und 7g: 25 γ Biotin + 25 mg Inositol/1000 ml nebst 935 bzw. 93,5, 9,35, 0,935 und 0,0935 γ β -Alanin/1000 ml

Im Hinblick auf die in der Literatur vorhandenen Diskrepanzen hinsichtlich der Wuchsstoffwirkung der D(—)-Pantothensäure bei Hefen sei zusammenfassend erwähnt, daß diese Substanz in unseren Versuchen, einzeln oder in Kombinationen mit (+)-Biotin, meso-Inositol und β -Alanin den Substraten beigemischt, keinen oder höchstens einen äußerst geringen fördernden Einfluß auf die Vermehrung der „Dézaley“-Hefe auszuüben vermochte. Im geprüften Konzentrationsbereich (0,0137 bis 1365,0 mg/1000 ml) zeigte sie aber auch keine hemmende Wirkung.

Zusammenfassung

Bei der auxo-heterotrophen Kulturweinhafe „Dézaley“ (Stamm CBS 2897 von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, isoliert von WIKÉN u. RICHARD 1951 b u. 1952) ermöglicht meso-Inosit in einer Nährlösung, welche Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle und Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle enthält, eine verhältnismäßig langsame Zellvermehrung, die ohne Induktionsperiode einsetzt und über angemessene Bebrütungszeiten nur zu einer relativ geringen Höchstausbeute an Zellen führt (Tab. 1—5, Kurve 2 in Abb. 1—4). In gleichzeitiger Anwesenheit von (+)-Biotin und meso-Inosit (25 γ bzw. 25 mg/1000 ml Substrat) tritt eine antagonistische Interferenz ein, indem Biotin über Zeitspannen, welche zwischen 72 und 500 Std schwanken, die Wuchsstoffwirkung des meso-Inosits hemmt (Tab. 1—5, Kurve 3 in Abb. 1—4; vgl. WIKÉN u. RICHARD 1951 b u. 1952).

Der erwähnte Antagonismus des (+)-Biotins gegen meso-Inosit wird durch D(+)-Pantothensäure und deren Bestandteil β -Alanin aufgehoben, während die zweite Komponente des Vitamins, D(—)-Pantoinsäure, unwirksam ist oder höchstens eine äußerst geringe Förderung des Hefewachstums auszuüben vermag (Tab. 1—5). In gleichzeitiger Gegenwart von 25 γ Biotin und 25 mg meso-Inosit pro 1000 ml Nährlösung tritt keine Hemmung der Zellvermehrung ein, wenn dem Substrat *vor der Impfung* mindestens 25 γ Ca-Pantothenat bzw. 935 γ β -Alanin pro 1000 ml beigemischt werden (Kurven 6a, 6b und 6c bzw. 7a in Abb. 1 bis 4 A). Beim Zusatz des Ca-Pantothenats bzw. des β -Alanins *vor der Impfung* der Substrate wird die hemmungsaufhebende Tendenz erst in den Konzentrationsbereichen 0,25—2,5 γ bzw. 9,35—93,5 γ pro 1000 ml sichtbar (Kurven 6g und 6d bzw. 7c und 7b in Abb. 1—4 A). Sowohl bei vollständiger Beseitigung des Antagonismus als auch beim Einsetzen der hemmungsaufhebenden Tendenz verhalten sich mithin die wirksamen Mindestkonzentrationen der Pantothensäure und des β -Alanins, bezogen auf molare Basis, wie 1 zu 100.

Ca-Pantothenat und β -Alanin üben auch beim Zusetzen *nach der Impfung* der Kultursubstrate *im Laufe der Hemmungsphase* eine hemmungsaufhebende Wirkung aus (Tab. 2, Abb. 4 B). Als noch wirksame Mindestkonzentrationen konnten 25 γ bzw. 935 γ festgestellt werden. Die Dauer der Hemmungsphase betrug dabei nur etwa 100 Std. Es ist möglich, daß bei größerer Dauer der Hemmung (vgl. WIKÉN u. RICHARD 1951 b u. 1952) niedrigere Werte für die noch aktiven Mindestkonzentrationen der erwähnten Wuchsstoffe ermittelt werden können.

Bei der „Dézaley“-Hefe wird eine Zellvermehrung, welche ohne Induktionsperiode einsetzt, mit maximaler Geschwindigkeit verläuft und zur maximalen Höchstausbeute an Zellen führt, erst durch Zusatz einer Kombination von (+)-Biotin und meso-Inosit mit D(+)-Pantothensäure

oder β -Alanin ermöglicht. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß dies auf das Vermögen der beiden letzten Wachstoffsstoffe, den Antagonismus des Biotins gegen meso-Inosit aufzuheben, zurückzuführen ist.

D(—)-Pantoinsäure übt im geprüften Konzentrationsbereich (0,0137 bis 1365,0 mg/1000 ml Substrat) keine hemmende Wirkung auf das Wachstum der „Dézaley“-Hefe aus (Tab. 3—5).

Diese Untersuchungen wurden am Institut für landw. Bakteriologie und Gärungsbiologie, Eidg. Techn. Hochschule, Zürich, ausgeführt und aus dem Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Den zuständigen Behörden sprechen wir den herzlichsten Dank aus. Wir danken ebenfalls der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, welche uns ein Präparat des D(—)- α -Oxy- β , β -dimethyl- γ -butyrolactons kostenlos überließ. Fräulein A. MOHLER danken wir bestens für sorgfältige Assistenz. Die Artbestimmung der „Dézaley“-Hefe verdanken wir Frau Dr. N. J. W. KREGER-VAN RIJ, Hefeabteilung, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Laboratorium voor Microbiologie, Delft.

Literatur

HARTELIUS, V., and G. JOHANSEN: C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **24**, 133 bis 140 (1946).

KING, T. E., and V. H. CHELDELIN: Arch. Biochem. **16**, 231—238 (1948).

MUELLER, J. H., and A. W. KLOTZ: J. Amer. chem. Soc. **60**, 3086—3087 (1938).

RYAN, F. J., C. KUNIN and R. BALLENTINE: J. Bact. **65**, 434—439 (1953).

SARETT, H. P., and V. H. CHELDELIN: J. biol. Chem. **159**, 311—319 (1945).

UNDERKOFER, L. A., A. C. BANTZ and W. H. PETERSON: J. Bact. **45**, 183—190 (1943).

WEINSTOCK, H. H., H. K. MITCHELL, E. F. PRATT and R. J. WILLIAMS: J. Amer. chem. Soc. **61**, 1421—1425 (1939). — WIKÉN, T., u. O. RICHARD: Antonie v. Leeuwenhoek **17**, 209—226 (1951a). — Schweiz. Z. allg. Path. **14**, 560—566 (1951b). — Antonie v. Leeuwenhoek **18**, 293—315 (1952). — WIKÉN, T., H. SOMM u. F. SULZER: Arch. Mikrobiol. **20**, 201—220 (1954). — WILLIAMS, R. J., and ELIZABETH M. BRADWAY: J. Amer. chem. Soc. **53**, 783—789 (1931). — WILLIAMS, R. J., C. M. LYMAN, G. H. GOODYEAR, J. H. TRUESDAIL and D. HOLADAY: J. Amer. chem. Soc. **55**, 2912—2927 (1933). — WILLIAMS, R. J., and E. ROHRMAN: J. Amer. chem. Soc. **58**, 695 (1936). — WILLIAMS, R. J., and J. H. TRUESDAIL: J. Amer. chem. Soc. **53**, 4171—4181 (1931).

(Aus der mikrobiologischen Abteilung des Instituts für Gärungsgewerbe, Berlin)

Versuche zur Erklärung der Schwimmfähigkeit von Kahlhefezellen*

Von
S. WINDISCH und C. C. EMEIS

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. April 1958)

Die Hautbildung von Kahlhefen auf Flüssigkeiten wird mit der Sauerstoffbedürftigkeit dieser Organismen in Zusammenhang gebracht (LAFAR 1905—1907). Es hat sich gezeigt, daß der Einfluß von Sauerstoff primär die Zellvermehrung bestimmt und daß erst sekundär bei Erreichen einer bestimmten Grenzkonzentration die Hautbildung einsetzt. So kann durch Atmungsblockierung und Sauerstoffentzug die Zellvermehrung und damit die Hautbildung unterdrückt werden (WINDISCH u. EMEIS 1958).

Versuche mit einer oberflächenaktiven Verbindung, Tween 80, führten ebenfalls zu einer Hemmung der Hautbildung und damit zu einer Aufhebung der Schwimmfähigkeit der Kahlhefezellen, ohne daß hier der Atmungsstoffwechsel und die Zellvermehrung behindert wurden (WINDISCH u. EMEIS 1958). Da die Zellen aber spezifisch schwerer als die Kulturflüssigkeit sind, scheint die Beobachtung, daß die Schwimmfähigkeit durch Zugabe von Tween 80 zur Kulturflüssigkeit verändert wird, bedeutungsvoll für eine Erklärung der Hautbildung bei Kahlhefen zu sein. Durch diese Beobachtung wurden wir zu vorliegender Untersuchung veranlaßt.

I. Methodik

Versuchsstämme waren zwei hautbildende Hefen, *Hansenula anomala* St. H1 und *Candida krusei* St. 17. Als Zuchtmedium diente synthetische Nährlösung nach OGUR (0,35% Pepton-Difco; 0,3% Hefeextrakt-Difco; 0,2% KH_2PO_4 ; 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2% Glucose in aqua dest.). Die Sterilisation der Grundlösung ohne Glucose erfolgte bei 120° C während 30 min im Autoklaven. Die Glucoselösung wurde steril filtriert und vor Versuchsbeginn in entsprechender Konzentration der Grundlösung zugesetzt. Die beimpften Kulturansätze wurden bei 27° C bebrütet.

Die Tween 80-Konzentrationen wurden in den Ansätzen durch Messung der Oberflächenspannung bestimmt, nachdem vorher gezeigt werden konnte, daß weder die Hefezellen die Messung störten noch in der synthetischen Nährlösung (ohne Tween 80) während der Kulturdauer sich die Oberflächenspannung änderte.

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag.

Die Bestimmung der Oberflächenspannung erfolgte mit Hilfe eines Stalagmometers bei einer Temperatur der zu messenden Flüssigkeit von 27° C. Der Einfachheit halber wurde nicht direkt die Oberflächenspannung, sondern die Tropfenzahl einer bestimmten Flüssigkeitsmenge, die aus dem Stalagmometer tropft, zur Tween 80-Konzentration in Beziehung gesetzt.

Abb. 1 zeigt die Eichkurven für Temperaturen von 27° und 15° C. Auf der Abszisse sind die Tween 80-Konzentrationen als Logarithmus zur Basis 2, auf der Ordinate die Anzahl der Tropfen aufgetragen. Der Logarithmus zur Basis 2 wurde gewählt, da zur Aufnahme der Eichkurven Zweier-Verdünnungsreihen verwendet wurden.

Zwischen Tropfenzahl und Oberflächenspannung besteht folgende Beziehung:

$$\delta = \frac{Z_w}{Z_x} \cdot s \cdot a \text{ dyn/cm},$$

δ = Oberflächenspannung der zu untersuchenden Flüssigkeit,

Z_x = Tropfenzahl der zu untersuchenden Flüssigkeit,

s = spezif. Gewicht der zu untersuchenden Flüssigkeit,

Z_w = Tropfenzahl des reinen Wassers,

a = Oberflächenspannung des reinen Wassers.

Die Keimzahlen wurden durch Auszählung in der Thoma-Kammer, die Kahlhautbildung visuell bestimmt.

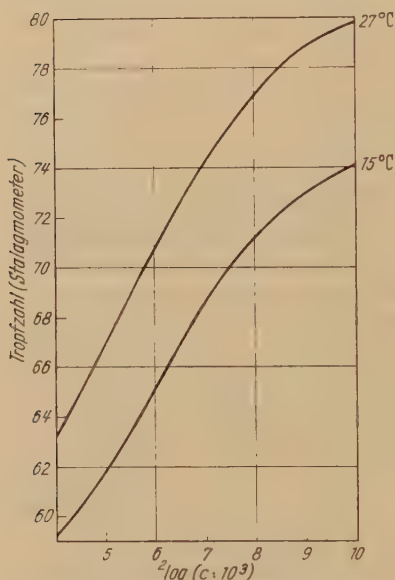


Abb. 1. Eichkurven zur Bestimmung der Tween 80-Konzentration in synthetischer Nährlösung bei 15° und 27° C. Ordinate: Tropfenzahl; Abszisse: Tween 80-Konzentration

II. Versuchsergebnisse

Zuerst wurde das Verhalten der Stämme *H 1* und *17* gegenüber verschiedenen Tween-Konzentrationen geprüft. Dabei zeigte sich, daß bei

einem Bebrütungszeitraum von 7 Tagen und bei Tween-Konzentrationen von 1—0,5 % die Hautbildung trotz guten, submersen Wachstums vollkommen unterbunden wurde. Bei geringeren Tween-Konzentrationen aber setzte bei längerer Bebrütungszeit Hautbildung ein, bei 0,1 % am 7. Tage, bei 0,02 % schon nach 48 Std und bei Kulturen ohne Tween 80 schon nach 20 Std. Das Verhalten der Stämme *H 1* und *17* unterschied sich dabei in keiner Weise. Diese Ergebnisse sprechen für eine Abnahme der Tween 80-Wirkung bei längerer Kulturdauer, zeigen aber nicht, worauf diese Wirkungsabnahme beruht.

Um diese Erscheinung näher zu untersuchen, wurden während der Kulturdauer die Zellzahl und die Tween 80-Konzentration quantitativ verfolgt. Die Ausgangskonzentration betrug bei diesen Versuchen 0,5 % Tween 80, die Ausgangskeimzahl $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Abb. 2 gibt das Ergebnis

dieser Untersuchungen wieder. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Wachstumskurve des Stammes *H 1* unter Einfluß von Tween 80. Im oberen Teil der Abbildung ist der Konzentrationsverlauf von Tween 80 in Abhängigkeit von der Kulturdauer aufgetragen. Bis zu einer Keimzahl von $2,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml bleibt die Tween 80-Konzentration unverändert, dann fällt sie aber plötzlich ab und nähert sich asymptotisch einem bestimmten Wert, der, wie weitere Versuche gezeigt haben, mit abnehmender Ausgangskonzentration von Tween 80 immer geringer wird. Mit dieser Konzentrationsabnahme kann die oben beschriebene Hautbildung bei langer Bebrütungszeit erklärt werden.

Diese Tween 80-Abnahme könnte einerseits durch einen enzymatischen Abbau erklärt werden, andererseits liegt aber, da es sich um eine oberflächenaktive Verbindung handelt, der Gedanke nahe, daß eine adsorptive Bindung an die Zelloberfläche stattfindet. Diese Frage könnte durch den Reaktionsverlauf entschieden werden. Liegt eine Adsorption vor, so müßte die Beziehung zwischen Zellzahl und Tween-Konzentration der „Freundlichschen Adsorptionsisotherme“ gehorchen, wobei allerdings gewisse Fehler durch die unterschiedliche Zellgröße in Kauf genommen werden müssen.

Die Gleichung der Adsorptionsisotherme lautet:

$$\frac{x}{m} = k \cdot c^{\frac{1}{n}}, \quad (1)$$

m = Menge des Adsorbens,

x = adsorbierte Menge,

c = Konzentration in der Lösung nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes,

k und n = Konstanten.

Durch Logarithmieren folgt aus Gl. 1 die Gleichung einer Geraden

$$\log \frac{x}{m} = \frac{1}{n} \log c + \log k. \quad (2)$$

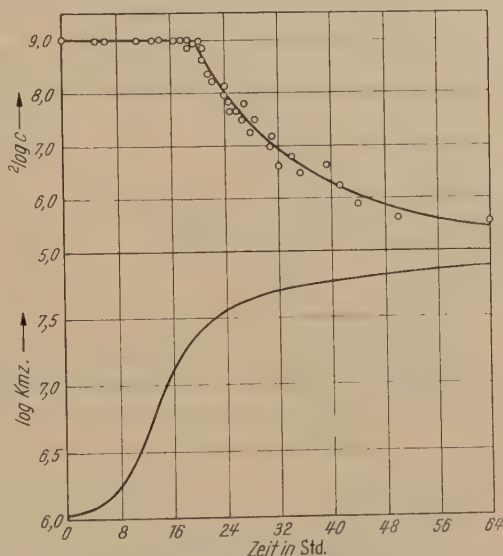


Abb. 2. Abnahme der Tween 80-Konzentration in der Kulturflüssigkeit des Stammes *H 1* (*Hansenula anomala*), zur Wachstumskurve in Beziehung gesetzt

Setzt man die Anfangskonzentration von Tween 80 $= c_0$, die Konzentration bei der Keimzahl $m = c$, so ist die adsorbierte Tween-Menge $x = c_0 - c$. Bei Einführung dieser Werte für m , c und x in die Gl. 2 muß, wenn eine Adsorption vorliegt, bei graphischer Darstellung das Bild einer Geraden entstehen.

Aus rechnerischen Gründen wurde bei Einsetzen der Werte in die Gleichung die Keimzahl durch 10^7 dividiert und die Tween 80-Konzentration mit 10^3 multipliziert. Hierdurch wird nur die Lage der Geraden im Koordinaten-System verschoben.

Bei Einsetzen der direkt aus der Wachstumskurve ablesbaren Keimzahlen in die Gl. 2 ergab sich nicht das Bild einer Geraden. Wenn aber

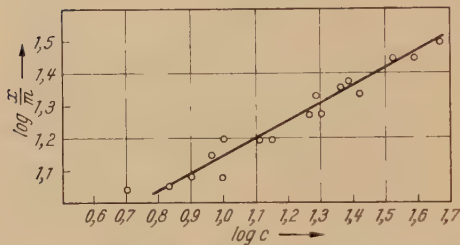


Abb. 3. Beziehung zwischen Keimzahl (St. H 1) und Tween 80-Konzentration

von diesen Keimzahlen der Wert $2,5 \cdot 10^7$ abgezogen, für m also Keimzahl minus $2,5 \cdot 10^7$ eingesetzt wurde, so erhielten wir, wie Abb. 3 zeigt, in guter Annäherung eine Gerade. Der Wert $2,5 \cdot 10^7$ wurde nicht willkürlich gewählt, er stellt die Keimzahl dar, bei der, wie aus Abb. 2 ersichtlich, die Abnahme der Tween-Konzentration beginnt. Dieser Befund macht es

wahrscheinlich, daß in der flüssigen Kultur der Kahlhefe H 1 das Tween 80 adsorptiv an die Zelloberfläche gebunden wird.

Weiter kann man daraus folgern, daß wahrscheinlich nicht alle Zellen Tween 80 adsorbieren, sondern nur diejenigen, die am Ende der logarithmischen Wachstumsphase neu gebildet werden, also ab einer Keimzahl von $2,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Beim Stamm 17 liegen die Verhältnisse ähnlich, nur daß hier die Adsorption schon bei einer Zellzahl von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml zu verzeichnen ist und daß die Menge des adsorbierten Tween 80 geringer ist.

Da in den bisherigen Versuchen nur das Verhalten der Stämme H 1 und 17 in Tween 80-haltiger Nährlösung untersucht wurde, mußte festgestellt werden, ob auch andere Kahlhefen den gleichen Effekt zeigen bzw. ob nicht-hautbildende Hefen kein Tween 80 adsorbieren. Zu diesem Zweck wurden eine Reihe hautbildender und nichthautbildender Hefen, die in der Tabelle aufgeführt sind, in die synthetische Nährlösung (siehe oben) geimpft.

Es erfolgte je ein Ansatz ohne und je einer mit Tween 80. Der Ansatz ohne Tween 80 diente zur Kontrolle der Hautbildung. Bebrütet wurde 48 Std bei 27°C . Danach wurde die Keimzahl, die Hautbildung bzw. die Konzentration von Tween 80 in den Ansätzen bestimmt.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß bei allen Stämmen, die nach einer Bebrütungszeit von 48 Std in der synthetischen Nährlösung Hautbildung

Tabelle. Hautbildung und Abnahme der Tween 80-Konzentration bei verschiedenen Hefen

Stamm	Hautbildung in Nährlösung ohne Tween 80	Keimzahl in Nährlösung mit Tween 80	Tween 80- Konzentration nach Bebrütung %
<i>Hansenula subpelliculosa</i>			
St. <i>javanica</i> B	+	$6,1 \cdot 10^7$	0,07
<i>Hansenula suaveolens</i> St. 1953 W	+	$2,8 \cdot 10^7$	0,09
<i>Hansenula anomala</i> B St. H2	+	$9,7 \cdot 10^7$	0,06
<i>Debaryomyces nicotianae</i>			
St. <i>membranaefaciens</i>	—	$2,6 \cdot 10^7$	0,50
<i>Pichia farinosa</i> St. P1 I/G	—	$1,9 \cdot 10^7$	0,50
<i>Pichia membranaefaciens</i> St. 27	+	$3,4 \cdot 10^7$	0,25
<i>Candida mycoderma</i> St. 24	+	$2,0 \cdot 10^7$	0,33
<i>Candida albomarginata</i> St. PSMO 15	—	$2,6 \cdot 10^7$	0,50
<i>Candida pelliculosa</i> St. C11 I/G	+	$1,8 \cdot 10^{7*}$	0,06
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> St. 37 F	—	$9,6 \cdot 10^7$	0,50

* *Candida pelliculosa* bildete stets Pseudomycel, so daß die Keimzählung schwierig war.

zeigen, diese bei Gegenwart von Tween 80 unterbleibt, und daß weiter die Konzentration von Tween 80 bei den hautbildenden Stämmen abgenommen hat. Die Abnahme ist allerdings von Stamm zu Stamm verschieden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß auch hier eine Adsorption von Tween 80 an die Zelloberfläche stattgefunden hat.

III. Diskussion

In einer früheren Arbeit (WINDISCH u. EMEIS 1958) war gezeigt worden, daß bei einigen Kahlhefen nur dann Hautbildung eintritt, wenn in der Kulturlösung eine bestimmte Grenzkeimzahl erreicht wird. Diese lag für den Stamm *H1* bei $3,2 \cdot 10^7$ Zellen/ml und für den Stamm *I7* bei $1,3 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Weiter konnte gezeigt werden, daß von dieser Grenzkeimzahl an das Wachstum der Kahlhefen langsamer verlief, wenn der Nährlösung Tween 80 zugesetzt worden war. Wir möchten annehmen, daß die in dieser Arbeit beschriebenen Keimzahlen, von denen ab das Tween 80 an die Zelloberfläche adsorbiert zu werden scheint, mit den Grenzkeimzahlen für die Hautbildung identisch sind.

Da die Grenzkeimzahlen für die Hautbildung einen Schwankungsbereich haben, der dadurch bedingt wird, daß die exakte Bestimmung des Beginns der Hautbildung schwer zu erfassen ist, ist anzunehmen, daß der vorhandene Unterschied von $3,2 \cdot 10^7$ zu $2,5 \cdot 10^7$ bei *H1* und von $1,3 \cdot 10^7$ zu $1,0 \cdot 10^7$ bei Stamm *I7* zum Teil durch die Schwankungsbreite erklärt werden kann. Weiter muß berücksichtigt werden, daß die Sauerstoffversorgung bei den unter Tween 80-Einfluß nur submers wachsenden Kulturen nicht ganz mit den Bedingungen einer Tween 80-freien Kultur vergleichbar sind, so daß auch hierdurch die Unterschiede in den erwähnten Keimzahlen entstehen können.

Die Adsorption von Tween 80 an die Zelloberfläche der hier untersuchten Kahlmhefen und die damit verbundene Unterdrückung der Hautbildung ermöglichen uns, eventuell einige Schlüsse auf die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen zu ziehen. Tween 80 (Polyoxyäthylen-Sorbitanmonooleat) ist eine nicht ionogene oberflächenaktive Verbindung mit lipophilen und hydrophilen Gruppen. Da die von uns untersuchten Kahlmhefen das Tween 80 in einem bestimmten physiologischen Stadium zu adsorbieren scheinen, liegt der Schluß nahe, daß die Oberfläche der Zellen in diesem Stadium einen lipophilen Charakter hat. Weiter spricht die Erscheinung der Hautbildung ebenfalls für das Vorhandensein lipophiler Gruppen in der Zelloberfläche, denn die Kahlmhefezellen zeigen eine schwere Benetzbarkeit und können daher, obwohl sie spezifisch schwerer als die Kulturflüssigkeit sind, auf der Oberfläche schwimmen.

In diesem Zusammenhang ist noch auf folgende Beobachtung hinzuweisen: Werden Kahlmhefen auf festem Nährboden kultiviert, so kann man feststellen, daß Flüssigkeitstropfen, die auf die Kulturoberfläche gebracht werden, diese ebenfalls nicht benetzen. Bei nichthautbildenden Hefen kann man diese Beobachtung nicht machen.

Werden nun die für die schwere Benetzbarkeit verantwortlichen lipophilen Gruppen durch das Tween 80 abgesättigt, so nimmt der hydrophile Charakter der Zellen zu, sie werden voll benetzt und können sich nicht mehr an der Oberfläche halten. Ähnliche Befunde sind schon bei anderen Mikroorganismen, z. B. bei Mykobakterien gemacht worden (DAMM 1956; DÖLL 1955; MINAMI 1957).

Die Tatsache, daß die Tween 80-Adsorption und, wie oben gezeigt, damit auch die Hautbildung nur in einem bestimmten physiologischen Zustand der Zellen stattfindet, kann von uns noch nicht erklärt werden. Da die Hautbildung aber mit der Sauerstoffversorgung der Kulturansätze im Zusammenhang zu stehen scheint, werden wir in dieser Richtung unsere Untersuchungen weiterführen.

IV. Zusammenfassung

In flüssigen Kulturen von Kahlmhefen findet eine Adsorption von Tween 80 an die Zelloberfläche statt. Dadurch wird die Benetzbarkeit der Zellen gesteigert und die für diese Organismen sonst typische Hautbildung auf flüssigen Kulturen unterbunden.

Die Untersuchungen wurden mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

- DAMM, H.: Zbl. Bakt. II. Abt. **109**, 349 (1956). — DÖLL, W.: Tuberk.-Arzt **9**, 108 (1955). — MINAMI, K.: J. Bact. **73**, 338, 345 (1957). — LAFAR, F.: Handbuch der technischen Mykologie Bd. IV, 307. Jena 1905—1907. — WINDISCH, S., u. C. C. EMEIS: Brauereiwiss. Beil. **11**, Nr. 4, 47 (1958).

(Aus der Botanischen Abteilung Madaus-Köln)

Untersuchungen über den Einfluß von Senfölen auf die Vermehrung des Influenza-Virus im exembryonierten Hühnerei*

Von

ARRIEN G. WINTER und LISEL RINGS-WILLEKE

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Juni 1958)

Gelegentlich der Nachprüfung der von WINTER u. WILLEKE (1952a, 1952b) und WINTER (1953a, 1953b, 1954a, 1954b, 1957) in vitro und in bestimmten Organen bei Tier und Mensch in vivo beobachteten antibakteriellen und antimykotischen Wirkung der Senföle aus *Lepidium sativum*, *Tropaeolum maius* und *Cochlearia armoracia* stellte GERMER (1954) eine gute therapeutische Wirkung dieser Substanzen bei grippalen Infekten fest, die er für virusbedingt hielt. Klinik und Praxis bestätigten diese Angaben in den folgenden Jahren in breitem Umfang. Auch ließ sich für die echte, durch Hirst-Titer identifizierte Virusgruppe der gleiche Nachweis erbringen.

Experimentell konnte GERMER zeigen, daß mit Q-Fieber (*Rickettsia burneti*) infizierte Meerschweinchen nach Zufütterung der Wirkstoffe aus *Tropaeolum maius* keine Fieberreaktion zeigen und daß die Komplementbindungsreaktion negativ bleibt. SCHARPENSEEL berichtete dann weiter von verblüffenden Erfolgen bei der Bekämpfung bzw. Prophylaxe der Newcastle-disease der Küken (atypische Geflügelpest) durch Zufütterung sehr geringer Mengen dieser Stoffe. Es erhob sich nun die Frage, ob diese Stoffe die Virusvermehrung direkt oder mittelbar über die Zelle beeinflussen. Wir neigten nach den Beobachtungen von HALBEISEN (1954) über die unspezifische Reizkörperwirkung des Wirkstoffes der Kapuzinerkresse (Benzylsenfö), die sich vor allem in einem anamnестischen Anheben abgeklungener Immuntiter nach peroraler Zufuhr dieses Senföls zeigt, zu der Ansicht, daß diese Stoffe die Virusvermehrung über eine Umsteuerung des physiologischen Geschehens in der Zelle beeinflussen (WINTER 1955b). Bestärkt wurden wir in dieser Auffassung durch die überraschende Wirkung der Senföle aus *Tropaeolum maius* auf die Eiweißverwertung in der Schweinemast (BOEGER, WESTERHOFF u. WINTER 1955), und bei der Aufzucht von Küken (SCHARPENSEEL 1955) und anderer Nutztiere (GERRIETS u. BROSELL 1957, BROSELL 1958).

* Herrn Prof. Dr. A. RIPPPEL zum 70. Geburtstag.

SPRÖSSIG u. SCHABINSKI konnten dann experimentell zeigen, daß die Vermehrung des Influenza-Virus in den Chorioallantoiszellen des embryonierten Hühnereies durch 2,5—10 γ Kressenwirkstoff/cm³ Nährlösung stark vermindert, aber nie ganz gebremst wird, während das Virus in vitro selbst bei Einbringen von 400 γ /cm³ keinen Aktivitätsverlust erleidet. Die verminderte Virusvermehrung ist dabei nach diesen Autoren mit einer reversiblen Verminderung der Zellatmung verknüpft. SPRÖSSIG u. SCHABINSKI schließen daher, daß die Virusvermehrung gebremst wird, weil keine ausreichenden Energiemengen für die Virussyntese zur Verfügung stehen. Diese Feststellungen dürften auf die in vivo-Verhältnisse übertragbar sein, weil wir nach den Untersuchungen von STICKL (1954) auf den Schleimhäuten — (das Benzylsenföl wird über den Respirations-trakt ausgeschieden und ist in Lunge, Speichel und Atemluft in aktiver Form nachweisbar) — Konzentrationen um 10 γ erwarten dürfen, wenn — wie in der Therapie üblich — pro Person und Tag 40—60 mg Kressenwirkstoff peroral verabreicht werden.

Es schien nun interessant, gleichsinnige Versuche mit anderen, in unserer Nahrung vorkommenden Senfölen anzustellen, um zu prüfen, ob vielleicht auch bei Verzehr von Meerrettich, Brunnenkresse usw. eine prophylaktische oder therapeutische Wirkung bei Virusinfektionen, insbesondere der echten Virusgrippe, oder grippalen Infekten zu erwarten ist. Zwei Gründe ließen diese Fragestellung als besonders naheliegend erscheinen:

1. Nach den Untersuchungen von WINTER u. Mitarb. zeigen auch Senföle aus anderen Pflanzen, wie z. B. dem Meerrettich, nach peroraler Aufnahme ein gleiches Schicksal im menschlichen Organismus wie das Benzylsenföl aus *Lepidium sativum* und *Tropaeolum*-Arten, d. h. sie werden betont über die Niere und die Schleimhäute des Respirations-traktes ausgeschieden (WINTER u. HORNBOSTEL 1953, HALBEISEN 1957).

2. Nach den Untersuchungen von RINGS-WILLEKE (unpubliziert) unterscheiden sich nun z. B. das Benzylsenföl und das Phenyläthylsenföl in ihrer Wirkung auf *Escherichia coli* und in der Beeinflußbarkeit ihrer antibakteriellen Aktivität durch Emulgatoren (WINTER u. WILLEKE 1957). Man konnte auf der einen Seite also eine ähnliche Wirkung dieser Senföle, auf der anderen Seite aber vielleicht eine gewisse Abwandlung der Wirkung auf die Virusvermehrung in der Zelle erwarten.

Wir wählten für diese vergleichenden Untersuchungen daher neben dem Benzylsenföl (synthetisch) das β -Phenyläthylsenföl (synthetisch), das in der Brunnenkresse (*Nasturtium officinale*), einer häufig genossenen Gemüsepflanze, vorkommt; ferner das Allylsenföl (synthetisch) als Bestandteil des Senföls aus *Cochlearia armoracia* und das native Gemisch von Allyl- und Methylthiopentylsenföl aus *Cochlearia armoracia*.

Methodik

Die Versuche wurden mit dem Influenzavirusstamm A/PR 8 nach der Züchtungsmethode von BERNKOPF (1949) mit 15—17 Tage alten Bruteiern durchgeführt.

Folgende Substanzen wurden in ihrer Wirkung auf die Virusvermehrung geprüft: Synthetisches Benzylsenföl, synthetisches β -Phenyläthylsenföl, synthetisches Allylsenföl und Spermölextrakt aus zerriebenen, fermentierten Meerrettichwurzeln.

Versuchsansätze: Da alle genannten Stoffe wasserunlöslich sind, wurden Lösungen in Tween 80 — als Lösungsvermittler — angesetzt, und zwar Benzylsenföl und β -Phenyläthylsenföl 4%ig. Das Allylsenföl wurde zunächst in Spermöl gelöst, um es als Hauptbestandteil des Meerrettichöls unter identischen Bedingungen mit dem nativen Spermölextrakt aus *Cochlearia armoracia* vergleichen zu können. Vom Allylsenföl- und Meerrettich-Spermöl, deren Gesamtsefölgelhalt in beiden Fällen 1,14 g/100 g Öl betrug, wurde ein Tween-Emulgat mit folgender Zusammensetzung hergestellt: 16,0 g Meerrettichöl bzw. Allylsenföl in Spermöl + 79,4 g Tween 80 + 8,0 g Aqua dest. Durch Verdünnen der Ansätze mit einer Hanksschen Nährlösung, die für die Stoffwechselleistung der Chorioallantoismembran im ex-embryonierten Ei als optimal angesehen werden kann, wurden die erforderlichen Konzentrationen eingestellt. Die Hankssche Nährlösung enthielt neben dem Senföl 100 IE/cm³ Penicillin und 40 γ /cm³ Streptomycin zur Unterdrückung eventueller bakterieller Infektionen.

Impfmateriel: 11 Tage alte Bruteier wurden mit Influenzavirus in einer Verdünnung von 10^{-3} in den Allantoissack geimpft; nach 48stündiger Bebrütung bei +35° C und anschließender 24stündiger Aufbewahrung bei +5° C wurde die Allantoisflüssigkeit entnommen. Der HA-Titer dieser frisch entnommenen Flüssigkeiten lag durchschnittlich bei 1:2560—1:5120. Für die Versuchsansätze wurde die Virulösung auf 1:160—1:320 mit Hanksscher Nährlösung verdünnt.

Die Virusvermehrung kann, wie erwähnt, prinzipiell von zwei Seiten her beeinflußt werden:

1. die der Vermehrung dienende Chorioallantoiszelle wird auf irgendeine Weise in der Virusproduktion gestört oder
2. es besteht eine Wirkung auf die Virusteilchen selbst.

Zu 1. Um diese Frage zu klären, wurden die Senföl-Tween-Emulgare mit Hanksscher Lösung auf 5 γ —2,5 γ —1,25 γ /cm³ eingestellt und gleichzeitig mit dem Virus in die exembryonierten Eier (pro Ei 20 cm³) eingefüllt. Pro Ansatz wurde ein Kollektiv von 5 Eiern verwendet. Als Kontrolle dienten 5 Eier mit in gleicher Weise infizierter Hanksscher Lösung. Sterile Gummikappen dienten als Verschuß der Eier. Sie waren von einer mit steriler Watte verschlossenen Glascapillare durchbohrt, durch die die Testflüssigkeit entnommen werden konnte.

Auf einer um 45° geneigten Drehscheibe wurden 36 Eier eingesetzt und mit 17 Umdrehungen/Std bei +37° C im Brutschrank bebrütet.

Die Probeentnahmen erfolgten nach 4—6—20—22—24—26—28—30—44 und 48 Std, pro Ei 0,25 cm³. Die jeweils von einem Kollektiv vereinigten Flüssigkeiten wurden geometrisch mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und dann 1:1 (0,5 cm³:0,5 cm³) mit einer frisch hergestellten 0,5%igen Hühnererythrocytenaufschwemmung versetzt. Nach 2 Std bei Zimmertemperatur (lichtgeschützt) konnte der Hämagglutinationstiter abgelesen werden.

Zu 2. Zur Prüfung der direkten Wirkung der Senföle auf das Influenzavirus wurden die Senföl-Tween-Emulgare mit Hanksscher Nährlösung auf 40 γ /cm³ verdünnt und dann 1:1 mit infizierter Allantoisflüssigkeit (HA-Titer 1:2560—5120) 15 Std vor Versuchsbeginn bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehengelassen. Durch die 1:1 Verdünnung wirkten also 20 γ /cm³ Senföl auf die Virusteilchen ein. Vor dem Einbringen in die exembryonierten Eier wurden die Ansätze 1:100 mit

Hanksscher Lösung verdünnt. Dadurch sank der Senfölgelhalt auf $0,2 \gamma/\text{cm}^3$, eine Konzentration, die auf die Chorioallantoizelle keinerlei Einfluß mehr ausübt. Als Kontrolle diente die infizierte Allantoisflüssigkeit, die 1:1 mit Hanksscher Lösung versetzt und in gleicher Weise wie die Senfölsätze behandelt wurde.

Der weitere Versuchsverlauf ist unter 1. beschrieben. Der Hämagglutinations-titer gibt einen Anhalt für die Virusvermehrung. Für beide Fragestellungen wurden

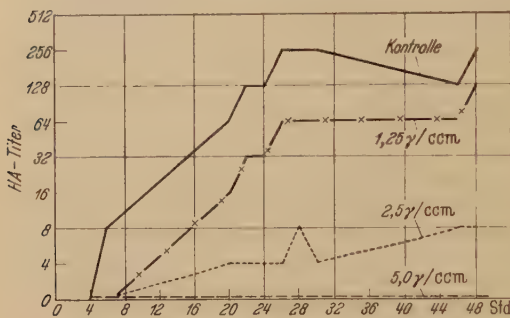


Abb. 1. Wirkung von Benzylsenföl auf die Vermehrung des Influenzavirus im embryonierten Hühnerei, gemessen am Hämagglutinationstiter (HA-Titer). Die Konzentrationsangaben in γ/cm^3 geben die Menge des Senföls je Kubikzentimeter Nährlösung an

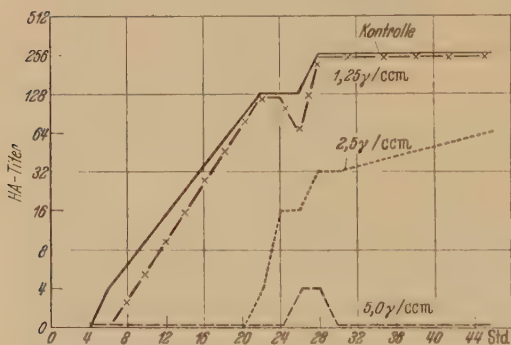


Abb. 2. Wirkung von Allylsenföl auf die Vermehrung des Influenzavirus im embryonierten Hühnerei, gemessen am Hämagglutinationstiter (HA-Titer). Die Konzentrationsangaben in γ/cm^3 geben die Menge des Senföls je Kubikzentimeter Nährlösung an

Der Zusatz in Mengen von $1,25$ – 10γ hemmt die Virusvermehrung, und zwar um so stärker, je höher die Senfölkonzentration ist. Bei $5 \gamma/\text{cm}^3$ wird kein Virus mehr in die Nährlösung ausgeschieden. Gewisse Unterschiede bestehen lediglich in der Intensität der Hemmung. So zeigte sich in den Versuchen von SPRÖSSIG u. SCHABINSKI bei $5 \gamma/\text{cm}^3$ eine zwar stark verzögerte, aber doch noch sehr deutliche Virusvermehrung.

Nun benutzten SPRÖSSIG u. SCHABINSKI einen Spermölextrakt aus *Tropaeolum minus*, der mit Tween 80 emulgiert wurde, während wir das

die Titer in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer kurvenmäßig dargestellt. Durch den Vergleich zwischen Kontroll- und Senfölkurven kann die Wirkung der Testsubstanzen beurteilt werden.

Die Beeinflussung der Zellatmung durch die Senföle wurde im Warburg-Apparat untersucht. Die Senfölsätze wurden in der gleichen Weise hergestellt wie oben beschrieben. Zusätzlich wurde eine 6%ige Lösung von Allylsenföl in Tween 80 geprüft. Es wurde der Sauerstoffverbrauch von 100 mg Chorioallantoisgewebe (Frischgewicht) während einer Versuchsdauer von 7 Std bestimmt. Für jeden Atmungsversuch mit Kontrolle und 2 bis 4 Senfölkonzentrationen wurde jeweils eine Chorioallantoismembran benutzt, da die Gewebe verschiedener Eier recht unterschiedlich reagieren können.

Ergebnisse

a) In vivo-Versuche

Die Ergebnisse (Abb. 1 bis 4) bestätigen für das Benzylsenföl zunächst grundsätzlich die Befunde von SPRÖSSIG u. SCHABINSKI.

Benzylsenfö (synthetisch) unmittelbar mit Tween 80 in „Lösung“ brachten. Aus früheren Untersuchungen über Emulgatorsysteme geht aber hervor, daß solche Versuchsergebnisse nur dann verglichen werden können, wenn völlig identische Versuchsbedingungen gewählt werden (WINTER und WILLEKE 1957).

Die Wirkung des Phenyläthyl- und des Allylsenföls (Abb. 2 u. 3) sowie des Spermölextraktes aus *Cochlearia armoracia* (Abb. 4) bestätigen zunächst unsere Vermutung, daß wahrscheinlich auch diese Senföle bzw. ihre Trägerpflanzen einen prophylaktischen bzw. therapeutischen Effekt bei Virusinfektionen der Schleimhäute auslösen können. Wie weit nun der Verzehr dieser Pflanzen im Zuge einer normalen Diät oder bei forcierter Dosierung therapeutisch ins Gewicht fällt, müssen klinische Beobachtungen klären. Hingewiesen werden muß auf die Tatsache, daß das Benzylsenfö einen etwas stärkeren Effekt auf die Virusvermehrung zeigt als die anderen Senföle.

Etwas überraschend war für uns angesichts der oben genannten Unterschiede von Phenyläthylsenfö und Benzylsenfö in ihrem Verhalten gegenüber *Escherichia coli* und bei Emulgierung mit Lösungsvermittlern, daß sie in diesen Versuchen über die genannten quantitativen Abweichungen hinaus keinerlei differente Wirkung erkennen ließen.

Da (Abb. 6) die Kurven für Meerrettich-Spermölextrakt und die Lösung von Allylsenfö in Spermöl gleichsinnig verlaufen, ist anzunehmen, daß die Wirkung des Meerrettichextraktes vor allem auf das Allylsenfö zurückzuführen ist.

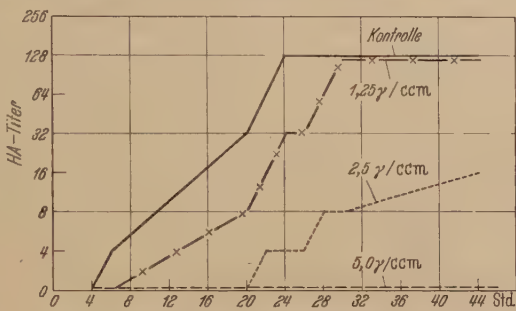


Abb. 3. Wirkung von Phenyläthylsenfö auf die Vermehrung des Influenza-Virus im exembryonierten Hühnerei, gemessen am Hämagglutinationstiter (HA-Titer). Die Konzentrationsangaben in γ/ccm geben die Menge des Senföls je Kubikzentimeter Nährlösung an

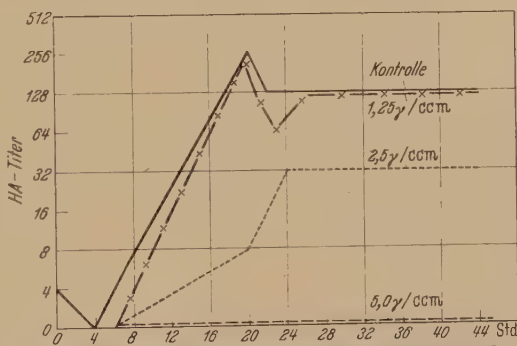


Abb. 4. Wirkung von Meerrettich-Senfö auf die Vermehrung des Influenza-Virus im exembryonierten Hühnerei, gemessen am Hämagglutinationstiter (HA-Titer). Die Konzentrationsangaben in γ/ccm geben die Menge des Senföls je Kubikzentimeter Nährlösung an

b) *In vitro*-Versuche

Die Unterschiede im Kurvenverlauf (Abb. 5—6) zwischen der Kontrolle und den mit $20 \gamma/\text{cm}^3$ vorbehandelten Ansätzen liegen in der Fehlergrenze, d. h. daß diese Senföle in Konzentrationen von $20 \gamma/\text{cm}^3$

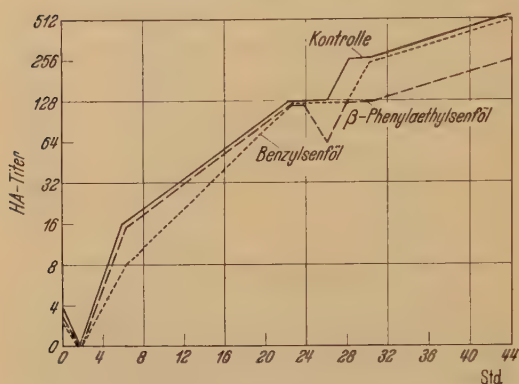


Abb. 5. Vermehrung von Influenza-Virus im exembryonierten Hühnerei nach 15 Std. Vorbehandlung des Virus in einer Lösung von 20γ Benzylsenföl bzw. β -Phenyläthylsenföl pro Kubikzentimeter

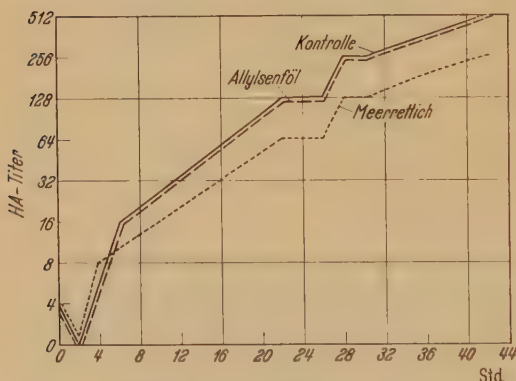


Abb. 6. Vermehrung von Influenza-Virus im exembryonierten Hühnerei nach 15 Std. Vorbehandlung des Virus in einer Lösung von 20γ Allylsenföl bzw. Meerrettich-wirkstoff (natives Gemisch von Allylsenföl und Methylthiopentylsenföl) pro Kubikzentimeter

keinen unmittelbaren inaktivierenden Einfluß auf das Influenza-Virus ausüben. Somit wirken alle untersuchten Senföle stets nur mittelbar über die Zelle auf die Vermehrung des Influenza-Virus ein.

c) *Atmungsversuche*

Ob die Vermutung von SPRÖSSIG u. SCHABINSKI, daß die verminderte Virusausscheidung bei Einbringung von Benzylsenföl auf eine reversible Hemmung der Zellatmung zurückzuführen ist, zutrifft, und ob diese Vermutung auch auf die anderen, hier untersuchten Senföle auszuweiten ist, konnten nur weitere Messungen der Zellatmung und andere stoffwechsel-physiologische Untersuchungen an Gewebekulturen von Chorioallantoiszellen (vgl. EATON 1952) klarstellen. Vorversuche ergaben, daß die Atmung der Chorioallantoiszellen auch bei völliger Hemmung der

Virusvermehrung durch 5γ Benzylsenföl/ cm^3 Nährlösung mit hoher Intensität weiterläuft.

Systematische Versuche mit dem Benzylsenföl (Abb. 7) ergaben bei $1,25 \gamma$ regelmäßig eine deutliche Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs um 10 bis 30% und zwar während der ganzen Versuchsdauer. Bei $2,5 \gamma$ wurde die Atmung etwas gehemmt, um bei $5 \gamma/\text{cm}^3$, also der Konzentration, die

zu einer völligen Hemmung der Virusvermehrung genügt, um 30–40% abzusinken. Bei Erhöhung der Konzentration auf 10 γ erfolgte eine weitere Hemmung des Sauerstoffverbrauchs in der Größenordnung, wie sie auch SPRÖSSIG u. SCHABINSKI gefunden hatten. SPRÖSSIG beobachtete dagegen bereits bei 1 γ eine Hemmung, und bei den übrigen Konzentrationen war die Minderung des Sauerstoffverbrauchs wesentlich stärker als bei uns. Man könnte geneigt sein, diese Abweichung damit in Zusammenhang zu bringen, daß wir ein Emulgat des Benzylsenföls mit Tween 80 in Lösung brachten, während SPRÖSSIG einen Spermölextrakt aus *Tropaeolum maius* mit Tween 80 emulgierte.

Als zusätzlicher Faktor war in seinem System also das emulgierte Spermöl vorhanden. Wir wissen aber aus früheren Untersuchungen (WINTER u. WILLEKE 1957), daß z. B. auch die bakteriostatische Wirkung mit Tween 80 emulgierten Benzylsenföls durch die Gegenwart von Spermöl beeinflusst wird. Doch scheint diese Annahme nicht stichhaltig, wenn man bedenkt, daß beim Allylsenföl mit und ohne Spermöl die Wirkung auf die Atmung gleichsinnig ist. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß nach RINGS-WILLEKE (unpubliziert) Allyl- und Benzylsenföl auf einen Zusatz von Spermöl z. B. bezüglich ihrer bakteriostatischen Wirkung unterschiedlich reagieren können.

Besonders interessant scheint uns die Beeinflussung der Zellatmung durch das Allylsenföl (Abb. 8). Die Atmungswerte bei 5–10 γ streuen um die Kontrollwerte. Aus einer größeren Anzahl von Versuchsserien, von denen zwei Versuche in Abb. 8 wiedergegeben sind, dürfen wir entnehmen, daß 5 γ Allylsenföl/cm³ Nährlösung, die ja (vgl. Abb. 2) zu einer völligen Hemmung der Virusvermehrung in den Chorioallantoiszellen genügen,

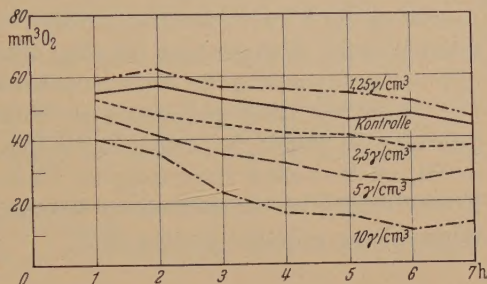


Abb. 7. Sauerstoffverbrauch von 100 mg Chorioallantoismembran im Warburg bei Zugabe von Benzylsenföl (4% Senföl in Tween 80 gelöst) in Konzentrationen von 10 γ —5 γ —2,5 γ —1,25 γ/cm^3 Nährlösung

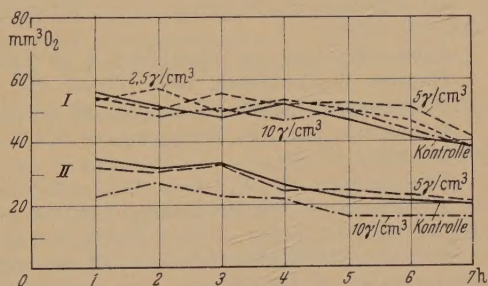


Abb. 8. Sauerstoffverbrauch von 100 mg Chorioallantoismembran im Warburg bei Zugabe von Allylsenföl (6% Senföl in Tween 80 gelöst) in Konzentrationen von 10 γ —5 γ —2,5 γ/cm^3 Nährlösung. Es sind zwei getrennte Versuche (I; II) dargestellt

keinen ungünstigen Einfluß auf die Atmung ausüben. Selbst bei 10 γ ist nur eine schwache Hemmung zu erkennen. Man gewinnt für 2,5 und auch 5 γ eher den Eindruck einer Atmungsstimulation. Gleichsinnige Ergebnisse haben wir mit Tweenemulgaten von Allylsenfölen in Spermol erhalten; hier trat bei 2,5 und z.T. noch bei 5 γ die Atmungssteigerung sehr deutlich (bis zu 30% Steigerung) hervor.

Diese Ergebnisse besagen, daß durch das Allylsenfölen eine völlige Sistierung der Virusvermehrung erfolgt, ohne daß die Zellatmung beeinträchtigt wird. Nun genügen bei allen untersuchten Senfölen 5 γ/cm^3 für eine völlige Bremsung der Virusvermehrung, so auch beim Benzylsenfölen. Das deutet auf einen gleichsinnigen Wirkungsmechanismus aller dieser Substanzen. Somit ist unwahrscheinlich, daß die durch 5 γ Benzylsenfölen erzielte völlige Hemmung der Virusvermehrung mit der bei dieser Konzentration zu beobachtenden Verminderung der Zellatmung in Zusammenhang gebracht werden darf.

Literatur

- BERNKOPF, H.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **72**, 680 (1949). — BOEGER, O., W. WESTERHOFF u. A. G. WINTER: Naturwissenschaften **42**, 464 (1955). — BROSELL, H. J.: Arch. f. Geflügelzucht **7**, 23 (1958).
 DANNENBERG, H., H. STICKL u. FR. WENZEL: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **303**, 248 (1956).
 EATON, M.: Arch. ges. Virusforsch. **5**, 53 (1952).
 GERMER, W. D.: Dtsch. med. Wschr. **79**, 1445 (1954). — GERRIETS, E., u. H. J. BROSELL: Tierärztl. Wschr. **70**, 152 (1957).
 HALBEISEN, TH.: Die Therapiewoche **5**, 130 (1954). — Arzneimittel-Forsch. **7**, 321 (1957).
 SCHARPENSEEL, H. W.: Arch. Geflügelkunde **19**, 380 (1955). — SPRÖSSIG, M., u. M. SCHABINSKI-STEPAN: Z. Hyg. **143**, 215 (1956). — STICKL, H.: Dtsch. med. Wschr. **79**, 1722 (1954). — Ärztl. Forsch. **9**, 553 (1955).
 WINTER, A. G.: Madaus Jahresber. **VI**, 43 (1953a); **VI**, 7 (1953b); **VII**, 7 (1954a). — Therapiewoche **5**, 126 (1954b). — Medizinische Nr. 2, 73 (1955a). — Zbl. Bakter. I. **164**, 217 (1955b). — Hippokrates **28**, 695 (1957). — WINTER, A. G., u. M. HORNBOSEL: Naturwissenschaften **40**, 489 (1953). — WINTER, A. G., u. L. WILLEKE: Naturwissenschaften **39**, 190 (1952a); **39**, 236 (1952b); **40**, 167 (1953). — Zbl. Bakter. I, **170**, 210 (1957).

	Seite
HASE, E., Y. MORIMURA, S. MIHARA and H. TAMIYA, The Role of Sulfur in the Cell Division of <i>Chlorella</i> . With 6 Figures in the text	87
HELVIG, R., Ein Beitrag zur mikrobiologischen Methode der Vitamin B ₆ -Bestimmung speziell im Pansen. Mit 1 Textabbildung	96
HORVÁTH, J., Dauernde Heterocaryose bei einer <i>Streptomyces</i> -Art mit verllorener Sporulationsfähigkeit. Mit 3 Textabbildungen	101
JANKE, A., und M. RÖHR, Über den Einfluß der Ernährung auf die Protein-Zusammensetzung von Essigbakterien	106
JANNASCH, H. W., Schwellenkonzentrationen verschiedener Stickstoffquellen für die Vermehrung einiger Bakterien aus nährstoffarmen Gewässern. Mit 3 Textabbildungen	114
KNÖLL, H., und W. NIKLOWITZ, Zur Feinstruktur der <i>Sarcina ventriculi</i> . Mit 11 Textabbildungen	125
KÜHLWEIN, H., und E. GALLWITZ, <i>Polyangium violaceum</i> nov. spec. Ein Beitrag zur Kenntnis der Myxobakterien. Mit 6 Textabbildungen	139
KUNISAWA, R., and R. Y. STANIER, Studies on the Role of Carotenoid Pigments in a Chemoheterotrophic Bacterium, <i>Corynebacterium poinsettiae</i> . With 4 Figures in the text	146
KÜSTER, E., und J. GIELESSEN, Der Einfluß sehr hoher Drücke auf <i>Aspergillus niger</i> . Mit 1 Textabbildung	157
LOCHHEAD, A. G., Two New Species of <i>Arthrobacter</i> Requiring Respectively Vitamin B ₁₂ and the Terregens Factor. With 5 Figures in the text	163
MARTIN, H. H., and J. W. FOSTER, On the Chromatographic Behavior of Dipicolinic Acid. With 4 Figures in the text	171
MEYER, R., and K. MEYER-PIETSCHMANN, Die Wirkung der Bestrahlung mit ultravioletttem Licht auf Mikroorganismen, untersucht an Einzell-Kulturen. Mit 16 Textabbildungen	179
NILSSON, R., and G. NILSSON, Studies concerning Swedish ropy milk. The antibiotic qualities of ropy milk. With 2 Figures in the text	191
NORRIS, J. R., and H. L. JENSEN, Calcium Requirements of <i>Azotobacter</i>	198
PFENNIG, N., Beobachtungen des Wachstumsverhaltens von Streptomyceten auf Rossi-Cholodny-Aufwuchsplatten im Boden. Mit 11 Textabbildungen	206
PRÁVE, P., Der Actinomycin-Einfluß auf den Stoffwechsel von <i>Candida albicans</i> . Mit 14 Textabbildungen	217
RADLER, F., Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. III. Die Energiequelle der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien	224
SCHLEGEL, H. G., Myxoxanthophyll als Hauptcarotinoid von <i>Mycobacterium phlei</i> . Mit 1 Textabbildung	231
SCHOPFER, W. H., et TH. POSTERNAK, Action d'antiinositols sur <i>Neurospora crassa</i> («inositolless») cultivé en milieu hautement purifié	240
STEINER, M., H. KATING und U. JENDRALSKI, Der Einfluß von Mg-Mangel auf die Fett- und Eiweißbildung von <i>Endomyopsis vernalis</i>	244
STILLE, B., Beobachtungen über das Verhalten von <i>Azotobacter</i> im Wurzelbereich höherer Pflanzen	255
STOLP, H., Über die spontane Mutation von Phagenresistenz nach Phagensensibilität. Mit 6 Textabbildungen	262
VON STOSCH, H. A., Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentrischen Diatomeen. III. Die Spermatogenese von <i>Melosira moniliformis</i> Agardh. Mit 5 Textabbildungen	274
TAHA, EZZ EL-DIN M., and TAHANI A. EL-ZEINI, The influence of Zinc, Copper, Iron and Manganese on the Mycological Production of Citric Acid in Surface Cultures. With 4 Figures in the text	283
WIKÉN, T., und CL. AGTHE, Über die Wechselwirkung der Wuchsstoffe meso-Inosit, (+)-Biotin, D (+)-Pantothersäure, β -Alanin und D (-)-Pantoinsäure bei der Kulturweihenefe „Dezaley“ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen). Mit 4 Textabbildungen	289
WINDISCH, S., und C. C. EMEIS, Versuche zur Erklärung der Schwimmfähigkeit von Kahlhefezellen. Mit 3 Textabbildungen	305
WINTER, A. G., und L. RINGS-WILLEKE, Untersuchungen über den Einfluß von Senfölen auf die Vermehrung des Influenza-Virus im exembryonierten Hühnerei. Mit 8 Textabbildungen	311

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Grundriß der Mikrobiologie

Von Dr. August Rippel-Baldes, o. Professor an der Universität Göttingen. Dritte Auflage. Mit 160 Abbildungen. VI, 418 Seiten Gr.-8°. 1955. Ganzleinen DM 45,—

Aus den Besprechungen:

Das Stoffgebiet der Mikrobiologie, das Rippel-Baldes in formvollendeter Darstellung gestaltet hat, wurde in diesem Lehrbuch so umgrenzt, daß es alles das bietet, was als Ergänzung dessen erwünscht und wirklich nötig ist, „was schon, insbesondere in der Botanik, bisher gelehrt wurde“. Damit wird ein heterogener Hörerkreis erfaßt und befriedigt, der sich „aus Naturwissenschaftlern, Chemikern und Landwirten zusammensetzt“. Erst bei gründlichem Studium des Buches wird man sich voll und ganz bewußt, wieviel da ergänzt werden muß und wie zahlreich und verschiedenseitig die Brücken und Fäden sind, die die Mikrobiologie mit der Makrobiologie verbinden. Umfassendes Wissen, reiche Erfahrung, vollendetes didaktisches Können sind die Bedingung, unter der es so meisterhaft gelingen konnte, alle diese oft sehr verborgenen Fäden aufzufinden und an richtiger Stelle in das harmonische Gesamtbild der Mikrobiologie einzufügen, einer relativ jungen Disziplin, die als eigene Wissenschaft ja erst umgrenzt werden muß. In der neuen Auflage ist auch die neueste Literatur berücksichtigt, und es ist bewundernswert, mit welcher Klarheit bei aller Knappheit des zur Verfügung stehenden Raumes auch Abschnitte behandelt werden, die sich auf Forschungsgebiete beziehen, die in stürmischer Entwicklung begriffen sind, wie etwa die über Antibiose und Antibiotika oder über Bakteriophagen. . . . „Protoplasma“

. . . Der Verfasser legte besonderen Wert auf die Herausarbeitung biologischer Zusammenhänge. So sind die physikalischen und chemischen Reaktionsmöglichkeiten des lebenden Plasmas unter der Einwirkung von Licht, Luft, Wirkstoffen, organischer und anorganischer Nahrung von allgemeiner Bedeutung und zeigen mannigfaltige Parallelen zum Geschehen in der Zelle der systematisch höheren Organismen. Die Verbreitung der Mikroorganismen in der Biosphäre, ihr Anteil am Kreislauf der Stoffe, an der Humusbildung, am Zusammenleben mit Pflanze und Tier machen eine Isolation des Gebietes unmöglich und betonen die vielfältigen Verbindungen zu den Nachbardisziplinen.

Das Buch ist nicht nur für Biologen, sondern besonders auch für Landwirte, Agrikulturchemiker und Bodenkundler ein unentbehrliches Hilfsmittel, da die Erhaltung und Mehrung der Bodenfruchtbarkeit in höchstem Maße von Umsetzungen abhängig ist, bei denen die Mikroorganismen eine große Rolle spielen.

„Zeitschrift für Pflanzenernährung“

. . . Die Darstellung ist im besten Sinn knapp, klar und immer kritisch, das Bildmaterial ist gut gewählt und instruktiv, die Zitierung der Literatur sehr glücklich. Gegenüber der 2. Auflage erfolgte Vermehrung der Abbildungen und des Umfangs, die neuesten Ergebnisse wurden, entsprechend gesichtet, kritisch verwertet. Das Buch ist für alle unmittelbar Interessierten unentbehrlich und wird darüber hinaus in vielen Fällen wertvolle Hilfe leisten können.

Professor Geitler, Wien, in „Österreichische Botanische Zeitschrift“

SPRINGER-VERLAG/BERLIN·GÖTTINGEN·HEIDELBERG